

**Fibroblasten-basierter VEGF-Transfer unter Nutzung eines Hypoxie-induzierten Vektors zur Modulation der Neoangiogenese im Bereich ischämischer Regionen myo-cutaner Transplantate**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Cornelia Eggers  
geboren am 13.04.1984 in Rudolstadt.

#### Gutachter

1. Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau, Universitätsklinik Jena
2. Prof. Dr. Dr. Henning Schliephake, Universitätsmedizin Göttingen
3. Prof. Dr. Dr. Klaus Dietrich Wolff, Technische Universität München

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05. Mai 2015

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
ANOVA	Analysis of variance
bFGF	Basic fibroblast growth factor
bspw.	Beispielsweise
ca.	Circa
CSF-1	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ECM	Extrazellularmatrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EPC	Endotheliale Vorläuferzellen
FGF	Fibroblast Growth Factor
Flt4	fms-related tyrosine kinase
h	Stunde
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HPF	High Power Field (Hauptgesichtsfeld)
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMG	Intussusceptive microvascular growth
IVTK	Institut für Versuchstierkunde und Tierschutz
kDa	Kilodalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
n	Menge
nm	Nanometer
NO	Stickstoff
NPR	Neurolipine
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	Signifikanzwert

p.c.	Post conceptionem
p.o.	postoperativ
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGE-2	Prostaglandin E2
PLGF	Placenta growth factor
PIGF	Placenta-Wachstumsfaktor
pVHL	Von-Hippel-Lindau tumor Suppressor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
Sog.	Sogenannte
TGF	Transforming Growth Factor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
u.a.	Unter anderem
Ub	Ubiquitinierung
v.a.	Vor allem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>3</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>5</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>7</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
2.1 Vascular Endothelial Growth Factor	9
2.1.1 Isoformen	9
2.1.1.1 VEGF-A	10
2.1.1.2 VEGF-B	10
2.1.1.3 VEGF-C	11
2.1.1.4 VEGF-D	11
2.1.1.5 VEGF-E	11
2.1.2 VEGF-Rezeptoren	11
2.1.2.1 Tyrosinkinase-Rezeptoren	12
2.1.2.2 VEGFR-3/ fms-related tyrosine kinase 4	13
2.1.2.3 Neuropilin-Rezeptoren	14
2.1.3 Regulation der VEGF-Expression	14
2.2 Neovaskularisation	15
2.2.1 Vaskulogenese	15
2.2.2 Angiogenese	16
2.3 Kutane Wundheilung	18
2.3.1 Inflammation	18
2.3.2 Proliferation	20
2.3.3 Remodellierung	21
<b>3 ZIELE DER ARBEIT</b>	<b>22</b>

<b>4 VEGF-TRANSFER BASED ON GENE-MODIFIED FIBROBLASTS USING A HYPOXIA-INDUCED VECTOR TO MODULATE NEOANGIOGENESIS IN ISCHAEMIC REGIONS OF MYO-CUTANEOUS TRANSPLANTS</b>	<b>23</b>
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>43</b>
5.1 Verschiedene Applikationssysteme im Vergleich	43
5.2 Untersuchung des Applikationszeitpunktes	45
5.3 Veränderung der Kapillaraussprossung	46
<b>6 SCHLUSSFOLGERUNG</b>	<b>49</b>
<b>7 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS</b>	<b>50</b>
<b>8 ANHANG</b>	<b>60</b>
8.1 Lebenslauf	60
8.2 Ehrenwörtliche Erklärung	62
8.3 Danksagung	63

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Wundheilung ist ein essentieller physiologischer Prozess mit dem Ziel der vollständigen Wiederherstellung von funktionell gleichwertigem Gewebe. Um dies zu verwirklichen ist die Sicherstellung von adäquater Ernährung des betreffenden Gewebes mittels Perfusion oder Diffusion erforderlich um den funktionellen Wiederaufbau zu gewährleisten. In allen höher entwickelten Individuen spielt der Blutfluss dabei eine zentrale Rolle.

Die Induktion der Angiogenese mittels VEGF zeigt bereits in vielen präklinischen Studien Erfolge durch verbesserte Revaskularisation in diversen Geweben und eine Reduktion der Nekrose in Hauttransplantanten. Die Verringerung des Transplantatverlustes aufgrund lokaler Ischämie und Nekrose durch die Induktion von lokaler Angiogenese ist von speziellem Interesse auf dem Gebiet der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie.

Basierend auf den vorangegangenen Studien soll nun untersucht werden, inwieweit der Applikationszeitpunkt sich auf die Neovaskularisation und VEGF-Expression in den unterschiedlichen Zielgeweben auswirkt. Hierzu wird der Effekt des hypoxia-inducible vascular endothelial growth factor (VEGF)-exprimierende Plasmid, pRTP801-VEGF<sub>165</sub> in Bezug auf die Blutgefäßausbildung im ischämischen Hinterlaufmodell der Ratte evaluiert. Insgesamt werden 180 Wistar-Ratten auf 3 Gruppen je 60 Tiere randomisiert verteilt. Nach Unterbindung der Arteria femoralis erhält Gruppe 1 das Plasmid pRTP801-VEGF<sub>165</sub>, Gruppe 2 erhält nicht transfektierte Fibroblasten und Gruppe 3 erhält Kochsalzlösung. Die Injektionen werden in subkutanes Gewebe sowie proximal und distal der Arterienunterbindung appliziert. Jeweils an Tag 3, 5, 7 und 14 nach Implantation werden Gewebeproben entnommen und die Haut- und Muskelangiogenese untersucht.

Die Explantate werden mittels Real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf VEGF-Gewebekonzentration und mittels Immunhistochemie CD31- und alphaSMA-Expression untersucht. Die histologischen Schnitte werden lichtmikroskopisch ausgewertet. Bestimmt werden die Gefäßanzahl sowie das Verhältnis der Anzahl zur Gesamtgesichtsfläche. Nach Ermittlung der Normalverteilung ist mittels einfaktoriellen ANOVA-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten und Gruppe geprüft worden. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p-Werten  $\leq 0,05$  werden als signifikant und p-Wert  $\leq 0,0001$  als hochsignifikant angenommen.

Die Ergebnisse zeigen eine signifikant höhere VEGF-Proteinexpression in Gruppe 1 verglichen mit Gruppe 2 ( $p \leq 0,001$ ) während des gesamten Untersuchungszeitraumes.

Im subkutanen Injektionsbereich zeigt sich in Gruppe 1 eine signifikante Erhöhung der VEGF-Gewebekonzentration am 14. p.o. Tag gegenüber Gruppe 2 und 3 (beide  $p \leq 0,001$ ). Die Anzahl der CD31-positiven Blutgefäße in Gruppe 1 im subkutanen Gewebe zeigt am 5. und am 14. p.o. Tag einen signifikanten Wachstum gegenüber Gruppe 2 und 3 (beide  $p \leq 0,001$ ). Im Verhältnis zur Gefäßfläche zeigte sich am 14. p.o. Tag ein signifikanter Anstieg in Gruppe 1 verglichen mit Gruppe 2 und 3 (beide  $p \leq 0,05$ ). Die Anzahl der VEGF-basierten alphaSMA-positiven Arteriolen verzeichnen am 5. p.o. Tag in Gruppe 1 einen signifikanten Anstieg ( $p \leq 0,004$ ) der Gefäßneubildung. Auch im Verhältnis zur Fläche bleibt ein signifikantes Maximum am 5. p.o. Tag bestehen.

Im distalen muskulären Injektionsbereich erreicht die Hypoxie-induzierte Versuchsgruppe ein Maximum der VEGF-Konzentration am 14. p.o. Tag. Die VEGF-basierenden CD31-positiven Blutgefäße zeigen einen Höchstwert vom 5. bis zum 7. p.o. Tag ( $p \leq 0,001$ ). Im Verhältnis zur Fläche bleibt es bei einem Höchstwert am 5. p.o. Tag. Kontrollgruppe und nicht-transfizierte Fibroblasten zeigen kaum unterschiedliche Werte. Die alphaSMA-positiven Arteriolen im distalen Muskelbereich sind im Verhältnis zu den CD31-positiv markierten Blutgefäßen quantitativ geringer ausgeprägt. Im Verhältnis zur Fläche zeigt sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied.

Im proximalen Muskelbereich zeigen sich keine signifikanten Ergebnisse.

Die subkutane Applikation von pRTP801-VEGF<sub>165</sub> zeigt einen langanhaltenden Effekt mit einer steigenden Expression von VEGF während des gesamten Beobachtungszeitraumes. Es scheint, dass die Verwendung von pRTP801-VEGF<sub>165</sub>-transfizierten Fibroblasten ein aussichtsvoller Weg sei um die frühe Angiogenese in ischämischem Gewebe zu induzieren.



## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Vascular Endothelial Growth Factor

#### 2.1.1 Isoformen

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist einer der bedeutendsten Signalmoleküle und entfaltet seine Wirkung sowohl in der Vaskulo- als auch in der Angiogenese (Lohela et al. 2009). Ferrara und Henzel isolieren ihn erstmals im Jahr 1989 (Ferrara und Henzel 1989). VEGF ist ein Heparin-bindendes Homodimer, bestehend aus zwei Untereinheiten mit jeweils einem Molekulargewicht von 23kDa. Es ist über zwei glykosylierte Disulfidbrücken verbunden (Muller et al. 1997) (Abbildung 1).



Abbildung 1: Molekulare 3D-Struktur des VEGF-Proteins. Disulfidbrücken sind rot markiert (Berman et al. 2000)

Zu der Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren gehören neben VEGF-A die Faktoren VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-F sowie der Placenta-Wachstumsfaktor PIGF. In Folge alternativen Splicens der mRNA entstehen unterschiedliche Isoformen, die ebenfalls als Dimer vorliegen (Korpelainen und Alitalo 1998). Die verschiedenen VEGF-Isoformen haben spezifische, wenn auch überlappende Rollen bei der Wachstumskontrolle neuer Blutgefäße (Veikkola und Alitalo 1999). Die Expression von VEGF verstärkt sich als Reaktion auf Hypoxie, aktiviert durch eine Vielzahl an Zytokinen. VEGF induziert die endotheliale Zellproliferation, fördert die Zellmigration und inhibiert Apoptose.

### 2.1.1.1 VEGF-A

Das VEGF-A-Gen besteht aus acht Exons und liegt auf Chromosom 6p21.3 (Vincenti et al. 1996). Durch alternativen Splicens der mRNA entstehen mindestens sieben VEGF-kodierende Transkripte mit 121, 145, 148, 165, 183, 189 und 206 Aminosäuren (Harry und Paleolog 2003). VEGF-A<sub>165</sub> ist die vorherrschende Isoform (Houck et al. 1992, Ferrara et al. 1992). Im normalen Gewebe ist die höchste VEGF-A mRNA in adulter Lunge, Niere, Herz und Nebenniere zu finden (Hoeben et al. 2004).

Grundlegend für die Bioverfügbarkeit und Rezeptorbindung der Isoformen ist die unterschiedliche Heparin-bindende Eigenschaft (Ferrara et al. 1992). Die Heparin-bindende Domäne bestimmt die Bindung an der Extrazellulärmatrix (ECM). Demnach sind Isoformen mit dieser Domäne (VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>189</sub>, VEGF-A<sub>206</sub>) fest mit der Oberfläche von Heparin-bindenden Proteoglykanen verbunden (Harry und Paleolog 2003). Isoformen ohne die Domäne sind daher diffusionsfähig (VEGF-A<sub>121</sub>). VEGF-A<sub>165</sub> beinhaltet nur eine Heparin-bindende Region und ist daher nur moderat diffusionsfähig (Ortega et al. 1999, Cross et al. 2003). VEGF-A ist vornehmlich ein wichtiger Mediator der Angiogenese und Vaskulogenese (Bauer et al. 2005).

### 2.1.1.2 VEGF-B

VEGF-B ist bereits seit 1995 bekannt (Olofsson et al. 1996). Es wird im adulten Myokard, Skelettmuskel und Pankreas exprimiert. VEGF-B besteht aus sieben Exons. Durch alternatives Splicen des Exon 6 entstehen die Isoformen VEGF-B<sub>167</sub> und VEGF-B<sub>186</sub> (Scrofani et al. 2000). Das C-terminale Ende von VEGF-B<sub>167</sub> ähnelt der Heparin-bindenden Domäne der Isoform VEGF-A und interagiert mit dem Korezeptor Neuropilin-1. VEGF-B<sub>167</sub> existiert demnach gebunden an Zelloberflächen während VEGF-B<sub>186</sub> frei verfügbar ist. Beide Isoformen werden als disulfidgebundene Homodimere gebildet, können jedoch mit VEGF-A disulfidgebundene Heterodimere bilden (Neufeld et al. 1999). Sie werden unterschiedlich stark exprimiert, wobei VEGF-B<sub>167</sub> bevorzugt gebildet wird, was vermuten lässt, dass alternatives Splicen streng kontrolliert wird (Olofsson et al. 1996, Olofsson et al. 1998, Joukov et al. 1997, Neufeld et al. 1999, Scrofani et al. 2000). Die Rolle von VEGF-B ist noch nicht abschließend geklärt. Studien zeigen, dass es eine weniger wichtige Rolle bei der

Bildung neuer Gefäßstrukturen spielt (Grimmond et al. 1996). VEGF-B inhibiert die pathologische Angiogenese durch Verringerung der Blutgefäße in verschiedenen Tiermodellen (Ferrara et al. 1996).

#### **2.1.1.3 VEGF-C**

Das VEGF-C-Gen besteht aus sieben Exons und kodiert für die drei Isoformen VEGF-C<sub>62</sub>, VEGF-C<sub>129</sub> und VEGF-C<sub>184</sub> (Wang et al. 2010). Das Protein wird besonders in Herz, Plazenta, Muskel, Ovarien und Dünndarm exprimiert. Kleinere VEGF-C-Konzentrationen sind in Gehirn, Leber oder Thymus zu finden (Hoeben et al. 2004). VEGF-C spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von lymphatischen Gefäßen (Jeltsch et al. 1997).

#### **2.1.1.4 VEGF-D**

VEGF-D ist erstmals 1998 beschrieben worden und ist strukturell verwandt mit VEGF-C. Das VEGF-D-Gen befindet sich auf Chromosom Xp22.31 lokalisiert (Yamada et al. 1997). Im adulten Gewebe befindet es sich vor allem in Herz, Lunge, Skelettmuskel, Dünndarm und Kolon (Achen et al. 1998). VEGF-D ist ein Aktivator für die Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3. Es bindet jedoch nicht an VEGFR-1 (Achen et al. 1998).

#### **2.1.1.5 VEGF-E**

Die Sequenz von VEGF-E ist erstmals im Genom des Parapox-Virus Orf entdeckt worden. Der Virus führt bei Mensch, Schaf, und Ziege zu massiver Kapillarproliferation und Dilatation. VEGF-E bindet mit starker Affinität an VEGFR2-Rezeptoren. VEGF-E stimuliert die Freigabe von Tissue factors, die Proliferation, Chemotaxis und Sprouting von kultivierten Endothelzellen in vitro und Angiogenese in vivo (Meyer et al. 1999).

### **2.1.2 VEGF-Rezeptoren**

Bisher sind drei VEGF-Rezeptoren mit folgender Ligandenbindung identifiziert über die VEGF die angiogene Wirkung vermittelt (Abbildung 2):

fms-like tyrosine kinase (Flt-1/VEGFR-1)	VEGF-A, VEGF-B, PLGF
kinase domain region (KDR/ Flk-1/VEGFR-2)	VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E
Flt-4 (VEGFR-3)	VEGF-C, VEGF-D

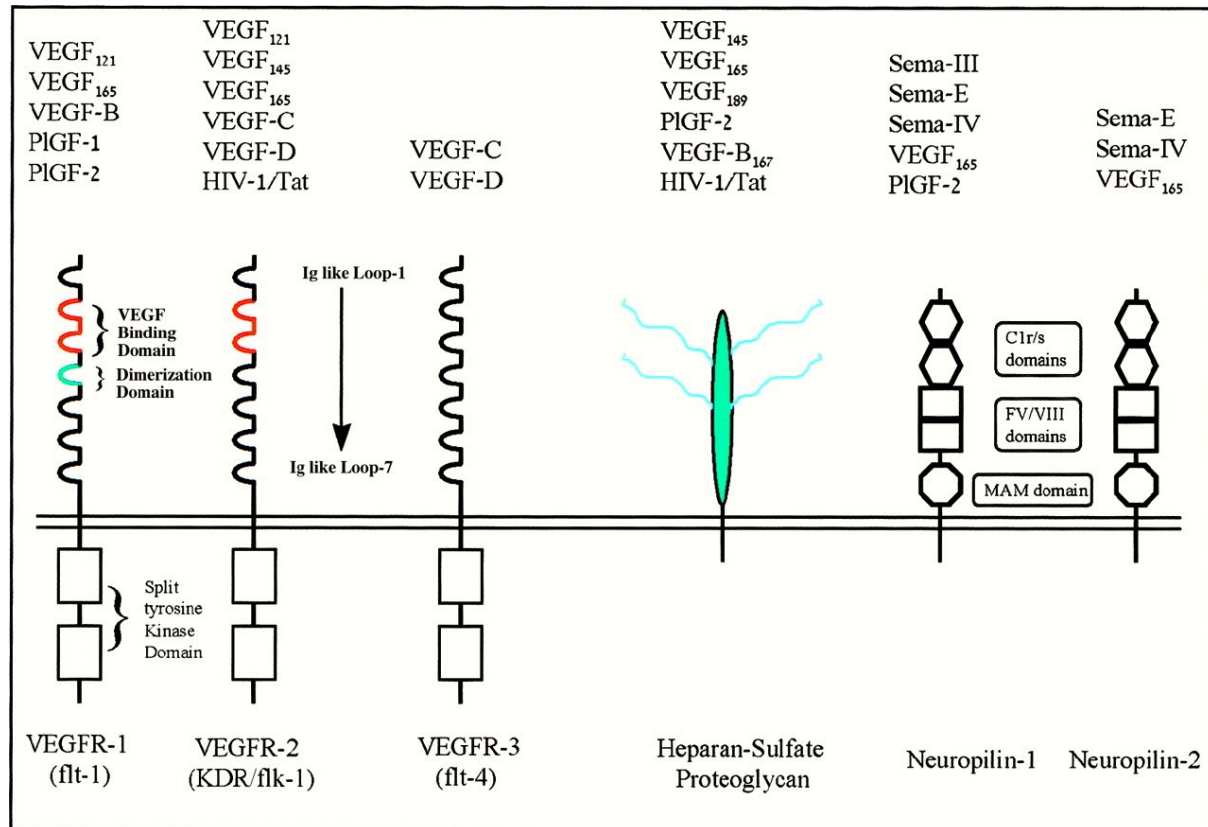


Abbildung 2: VEGF-Familie und Rezeptoren (Neufeld et al. 1999)

Jeder Tyrosinkinase-Rezeptor besteht aus sieben extrazellulären immunoglobulin-like Domänen, eine Transmembran-Domäne sowie einer Tyrosinkinasesequenz mit einer Kinase-Insert Domäne (Shibuya et al. 1990, Ferrara und Davis-Smyth 1997, Ortega et al. 1999).

### 2.1.2.1 Tyrosinkinase-Rezeptoren

Die funktionelle Bedeutung von VEGF und deren Rezeptoren ist in diversen Knock-out-Experimenten durch Ausschaltung der Rezeptoren erläutert. Die Eliminierung beider Allele der VEGF-Rezeptorgene 1 und 2 ist letal. Homologe VEGFR-2-defiziente Mausmodelle enden um den 8. Tag p.c. letal aufgrund eines frühen Entwicklungsdefekt der hämopoetischen und endothelialen Zellen (Shalaby et al. 1995). Die VEGFR-1-Knockout-Mäusen sind zwar imstande Endothelzellen auszubilden, jedoch fehlt die geordnete tubuläre Formierung und somit

funktionsfähige Gefäße (Fong et al. 1995). Die Wirkung von VEGFR-1 während der Embryogenese liegt demnach auf einem späteren Differenzierungsabschnitt als die von VEGFR-2 (Hanahan 1997). Weitere Untersuchungen zu den Funktionen der Rezeptoren zeigen zudem, selbst das Fehlen nur eines Allels ist letal. Die Tiere versterben vor Geburt aufgrund von Entwicklungsstörungen des Herz-Kreislauf-Systems (Ferrara et al. 1996, Carmeliet 2003, Carmeliet et al. 1996)

Im adulten Organismus vermittelt VEGFR-2 die Mehrheit der VEGF-induzierten Neovaskularisation wie mikrovaskuläre Permeabilität, Endothelzellproliferation, Invasion und Migration (Hicklin und Ellis 2005, Waltenberger et al. 1994). Die Aktivität und Signaltransduktion von VEGFR-2 kann positiv oder negativ durch die Ko-Expression und Aktivität von VEGFR-1 beeinflusst werden (Ogawa et al. 1998, Park et al. 1994). VEGFR-2 zeigt weniger Affinität zu VEGF-A als VEGFR-1 (Ferrara und Davis-Smyth 1997).

Die genaue Funktion von VEGFR-1 in Endothelzellen wird kontrovers diskutiert. Der Rezeptor zeigt trotz stärkster Affinität nur eine geringe Tyrosinkinaseaktivität (Terman et al. 1994). Während der Embryogenese moduliert VEGFR-1 die Teilung von Endothelzellen in den frühen Stadien der Gefäßentwicklung (Neufeld et al. 1999). In Monozyten induziert der Rezeptor die Migration sowie Aktivierung dieser. Zusätzlich induziert die Interaktion von VEGF-A<sub>165</sub> und VEGFR-1 Chemotaxis in polymorphkernigen Zellen (Barleon et al. 1996). Zudem kann er inhibitorisch auf die proangiogenen VEGFR-2-Effekte wirken und somit potentiell negativ pathologische Vaskularisation beeinflussen (Dvorak 2000). Die Aktivität und Relevanz von VEGFR-1 scheint stark abhängig von Umgebungsfaktoren (Kofaktoren, Konzentration, Zelleigenschaften) zu sein und ist weiterhin Gegenstand zahlreicher Studien. Es wird angenommen, dass VEGFR-1 den Endothelzellzyklus anhand von mehr als nur einem Signalweg beeinflusst (Kearney et al. 2002).

#### **2.1.2.2 VEGFR-3/ fms-related tyrosine kinase 4**

Während der Embryonalentwicklung findet sich VEGFR-3/ Flt4 zunächst in allen Endothelzellen. Im adulten Gewebe existiert es jedoch nur noch in lymphatischen Zellen. Er führt zur Stimulation von Mitose, Migration, Differenzierung und Proliferation der Zellen und spielt somit eine primäre Rolle in der Angiogenese (Achen et al. 1998, Lee et al. 1996). Liganden für den Rezeptor sind VEGF-C und VEGF-D.

### 2.1.2.3 Neuropilin-Rezeptoren

Neuropiline (NPR) sind zum einen Rezeptoren für Semaphorinen der Klasse 3 und zum anderen isoform-spezifische VEGF-Rezeptoren (Zachary et al. 2009). Neuropilin-1 bindet an VEGF-A<sub>165</sub> und im Falle einer Koexpression mit VEGFR-2 wird die Bindung zwischen VEGF-A<sub>165</sub> und VEGFR-2 um das 4-6-fache verstärkt. Endothelzellen mit Koexpression der Rezeptoren zeigt eine 2,5-fache verstärkte Chemotaxis gegenüber VEGF-A<sub>165</sub> als Endothelzellen mit nur VEGFR-2 (Soker et al. 1998). Die abschließende Funktion der NPR in der Signaltransduktion ist noch weitgehend unklar und bleibt zu klären.

### 2.1.3 Regulation der VEGF-Expression

VEGF wird in einer Reihe von Zellen als Antwort auf lösliche Mediatoren (bspw. Cytokine und Wachstumsfaktoren), zellgebundene Stimuli (bspw. CD-40 Ligand) oder Umgebungsfaktoren (bspw. Hypoxie) exprimiert.

Viele Wachstumsfaktoren führen zu einer erhöhten Expression von VEGF-mRNA, darunter Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Keratinocyten Growth Factor (KGF), Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Frank et al. 1995), Insulin-like Growth Factor (IGF-1) (Warren et al. 1996), Fibroblast Growth Factor (FGF) (Murakami und Simons 2008) und Plaket-derived Growth Factor (PDGF) (Finkenzeller et al. 1997). Zusätzlich wird die VEGF-Expression durch inflammatorische Interleukine wie IL-6 (Cohen et al. 1996), IL-2 und PGE-2 (Ben-Av et al. 1995) erhöht und geht somit einher mit der Hypothese, VEGF sei ein Mediator der Angiogenese von Entzündungserkrankungen (Ben-Av et al. 1995). Andere Zytokine wie IL-10 und IL-13 hemmen hingegen die VEGF-Expression (Matsumoto et al. 1997).

Auch Hormone selbst spielen bei der VEGF-Regulierung eine Rolle. Gonadotropine zeigen eine starke Induktion der VEGF-Transduktion in Ovarien sowohl in vivo (Shweiki et al. 1993, Ferrara et al. 1998) als auch in vitro (Christenson und Stouffer 1997). Auch Sexualhormone (Stewart et al. 2001) und humanes Choriongonadotropin (Schwarzenbach et al. 2004) führen zu einer erhöhten VEGF-Produktion. Östrogen zeigt sich als direkter Transkriptionsaktivator (Mueller et al. 2000).

Die zentrale Rolle der VEGF-Expression nimmt jedoch die Sauerstoffverfügbarkeit ein. Je nach der O<sub>2</sub>-Konzentration im umliegenden Gewebe

wird die Transkription hoch- oder herunterreguliert. Dabei induziert Hypoxie eine erhöhte Expression (Shweiki et al. 1992), während Hyperoxie sie eher inhibiert (Perkett und Klekamp 1998).

Maßgeblich beteiligt an der hypoxiebedingten VEGF-Regulation ist der Hypoxia-inducible Factor-1 (HIF-1) (Semenza 2002). HIF-1 ist ein heterodimeres, Helix-loop-Helix Protein mit zwei Untereinheiten: der induzierbaren HIF-1 $\alpha$  und der konstant exprimierten HIF-1 $\beta$ -Unterheit (Wang und Semenza 1995).

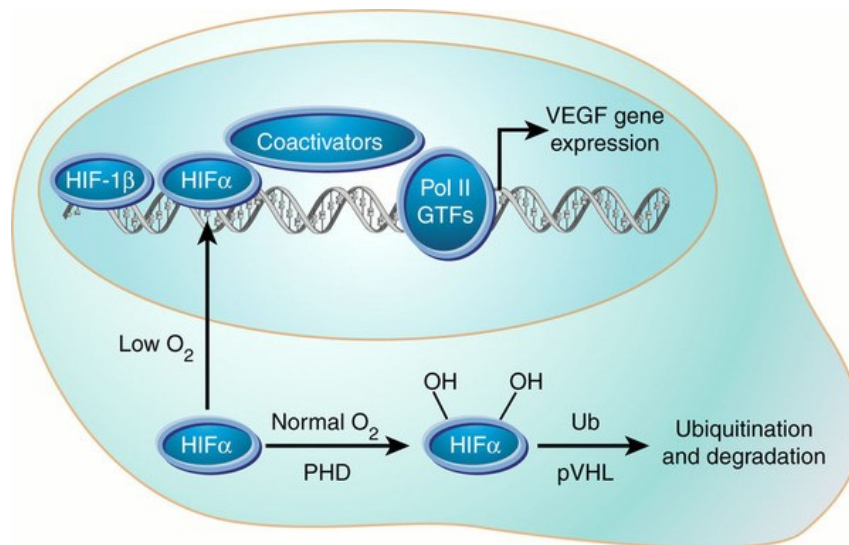


Abbildung 3: Der HIF-1 Signalweg (Schipani 2008)

Während Normoxie ist HIF-1 $\alpha$  an zwei spezifischen Prolyl-Resten hydroxyliert. In Folge dieser Hydroxylierung wird HIF-1 $\alpha$  über das Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor-Gen ubiquitiniert und degradiert (Mole et al. 2001). Im Kontrast dazu wird die Hydroxylierung während Hypoxie gehemmt und HIF-1 stabilisiert. HIF-1 interagiert mit Kofaktoren und induziert die Transkription von VEGF (Semenza 2007) (Abbildung 3).

## 2.2 Neovaskularisation

### 2.2.1 Vaskulogenese

Das Gefäßsystem sichert den optimalen Blutfluss und damit die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff. Es existieren zwei verschiedene Mechanismen der Entstehung neuer Blutgefäße. Die Vaskulogenese bildet Gefäßstrukturen durch die Differenzierung von Endothelzellen (Pandya et al. 2006, Drake 2003). Im Gegensatz dazu formieren sich bei der Angiogenese neue

Blutgefäße aus bereits vorbestehenden Gefäßen durch Proliferation und Migration von Endothelzellen v.a. im Embryo und unter bestimmten Bedingungen beim Erwachsenen (Kalka et al. 2000, Carmeliet 2003).

Während der Vaskulogenese differenzieren sich im Blut zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (EPC) zu Endothelzellen (Risau und Flamme 1995, Asahara et al. 1997). VEGF und seine Rezeptoren sind unabdingbar für die Mobilisation von EPCs auf dem Knochenmark sowie die Rekrutierung zu verschiedenen Körperstellen gemäß des bestehenden Hypoxieniveaus (Adams und Alitalo 2007). Je nach Stimuli können die rekrutierten Endothelzellen zum zirkumferenten Ausbau direkt in die Gefäßwand eingegliedert werden oder aussprossen und das angiogene Wachstum unterstützen. Außerdem sind sie in der Lage, durch weitere Stimulation zu proliferieren und als perivaskuläre Zellen auszusprossen (Risau et al. 1988, Adams und Alitalo 2007) (Abbildung 4).

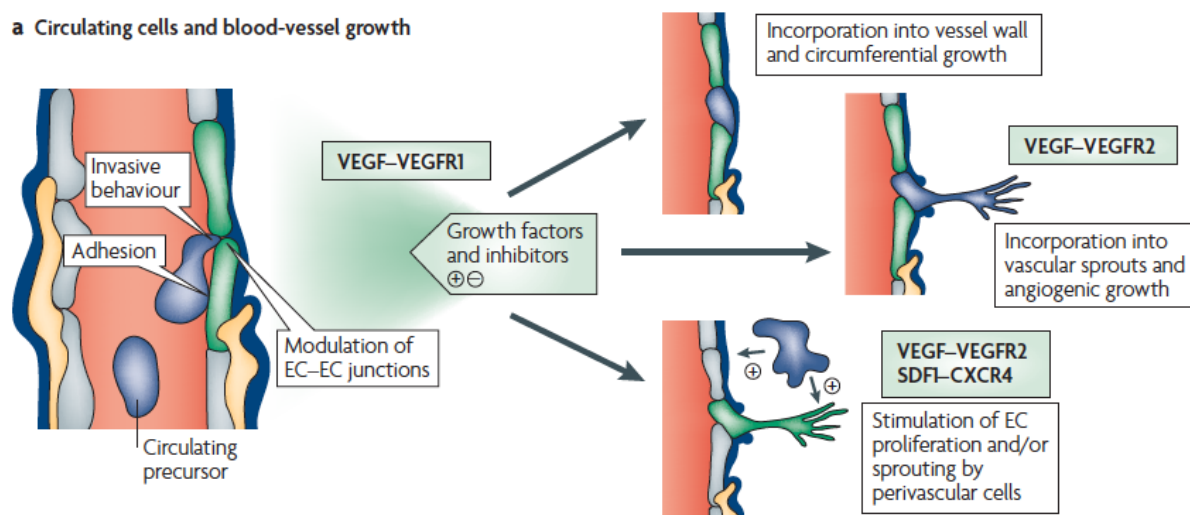


Abbildung 4: Darstellung der Vaskulogenese (Adams und Alitalo 2007)

## 2.2.2 Angiogenese

Mittels Angiogenese können neue Gefäße entweder durch Endothelaussprossung (Sprouting) oder durch Gefäßteilung (Intussusception) entstehen (Patan 2004). Bei der Entstehung dieser neuen gefäßartiger Strukturen durch Gefäßaussprossung überwiegt der Einfluss der pro-angiogenen Faktoren wie bspw. NO, VEGF und Angiopoitin induziert durch Hypoxie (Pugh und Ratcliffe 2003). Stickstoff induziert die Gefäßdilatation und VEGF führt zur Degradierung der Basalmembran und somit zum Verlust der Polarität. Spezialisierte Endothelzellen



sog. Tip cells sind dadurch imstande, sich aus dem Gefüge der Gefäßwand zu lösen (Abbildung 5b) (Ashrafpour et al. 2004, Gridley 2001, Adams und Alitalo 2007). Die direkte Migration in Richtung pro-angiogenen Gradienten ist v.a. induziert durch VEGF und Angiopoitin-2 (Clapp et al. 2009). Die Endothelzellen sezernieren eine Mischung aus Metalloproteasen und anderen Enzymen, die die Extrazellulärmatrix modifizieren und die Aussprossung erleichtern. Proteasen vereinfachen die Gefäßaussprossung durch Freigabe von ECM-gebundenen Gefäßaktivatoren (VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ ) und Interleukinen (IL-1 $\beta$ ). Die aufgelockerte ECM erlaubt Integrin-induzierte Endothelzelladhäsion ( $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$ ) und Integrin-Signaling, welche mittels Interaktion mit den VEGF- und bFGF-Rezeptoren entweder die Endothelzellproliferation vorantreiben oder inhibieren (Abbildung 5c) (Serini et al. 2006). Zur Stabilisierung des entstandenen Gefäßsprosses induzieren die Endothelzellen die Anlagerung von Perizyten. Durch entstehende Interaktionen zwischen Tip cells kommt es zunächst zur intrazellulären und später zur interzellulären Fusion der Vakuolen benachbarter Gefäße (Abbildung 5d) (Kamei et al. 2006). Die Verbindung der Hohlräume führt zur Ausbildung eines Lumens (Parker et al. 2004). Der anschließende Blutfluss mit Sauerstofferhöhung führt zur Verringerung der VEGF-Konzentration und somit zur Reduktion der Endothelzellproliferation (Clapp et al. 2009, Adams und Alitalo 2007).

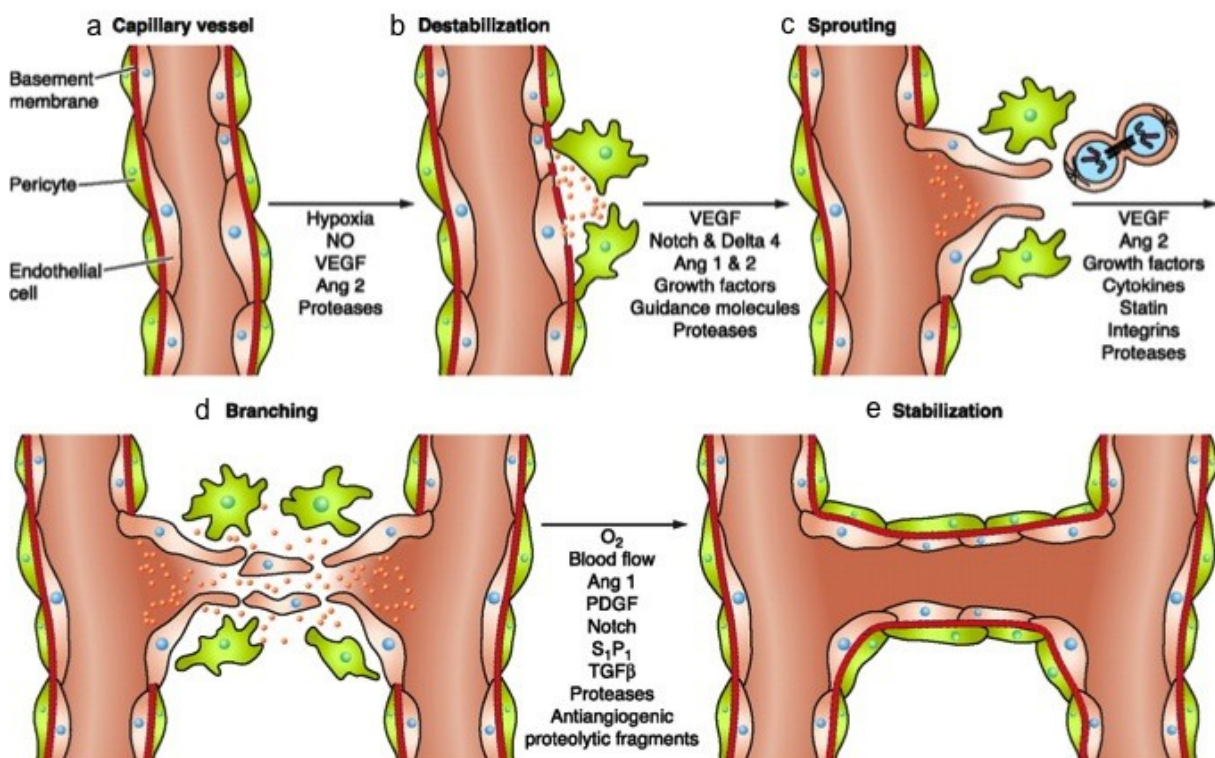


Abbildung 5: Darstellung der Angiogenese (Clapp et al. 2009)

Gefäßneubildung durch Intussusception (IMG) basiert auf Teilung bereits bestehender Gefäße. Der Vorteil dieses Mechanismus besteht darin, dass Blutgefäße wesentlich schneller gebildet werden und die Kapillaren weniger Schwachstellen im Wandaufbau aufweisen (Ribatti und Djonov 2012). Dieser Weg der Gefäßneubildung wird erstmals bei der postnatalen Lungenentwicklung bei Ratten beobachtet (Burri und Tarek 1990). Aktuell ist noch kein spezifisches Molekül herausgefiltert, welches IMG induziert. Jedoch VEGF, PDGF und Erythropoitin werden als potenzielle Induktoren identifiziert (Hellstrom et al. 1999, Wilting et al. 1996, Crivellato et al. 2004, Sorg et al. 2013).

## **2.3 Kutane Wundheilung**

Die kutane Wundheilung ist ein dynamischer interaktiver Reparaturvorgang bei dem eine Vielzahl an Zelltypen, Mediatoren, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Proteasen und Bestandteile der Extrazellulärmatrix beteiligt sind. Der Prozess der Wundheilung wird in drei sich überlappende Phasen unterteilt: Inflammation, Proliferation und Remodellierung (Martin 1997, Singer und Clark 1999).

### **2.3.1 Inflammation**

Das Gewebetrauma verursacht eine Verletzung von Blutgefäßen und schlussfolgernd die Extravasation von Blutbestandteilen. Direkt nach dem Trauma folgt neben der Hämostase, die eine provisorische extrazelluläre Matrix für die Zellmigration bildet, eine Entzündungsreaktion (Abbildung 6). Die Bildung des Fibrinpfropfes dient dazu, die Blutung zu stoppen und die Eintrittspforte für Krankheitserreger zu verschließen (Singer und Clark 1999). Der Fibrinpfropf wird hauptsächlich aus einem Netz von Fibrinfäden mit sich darin verfangenden Thrombozyten gebildet. Die Fibrinfäden entstehen durch die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin. Zahlreiche intrinsische Aktivitäten an dem intakten Blutgefäßendothel limitieren den Fibrinkoagel auf den geschädigten Bereich. Diese Aktivitäten beinhalten die Freisetzung von Prostacyclinen, Oberflächenbindung von Antithrombin III, Bildung von Protein C sowie die Freisetzung von Plasminogenaktivierenden Faktor (Clark 1993). Der gebildete Komplex stellt eine vorläufige extrazelluläre Matrix dar, der den Zellen während der Wundheilung als Migrationsbasis dient. Neben der Bildung des Koagels ist eine weitere essentielle Funktion der aktivierten Thrombozyten die Sezernierung von Cytokinen, bspw. PDGF (Ross et al. 1986), TGF- $\alpha$  (Derynck 1986) und TGF- $\beta$  (Sporn et al. 1987). Die

Aktivierung der Thrombozyten und folglich die Freigabe von Wachstumsfaktoren stellt den initialen Schritt der Wundheilung dar (Martin 1997, Singer und Clark 1999, Clemetson 2012).

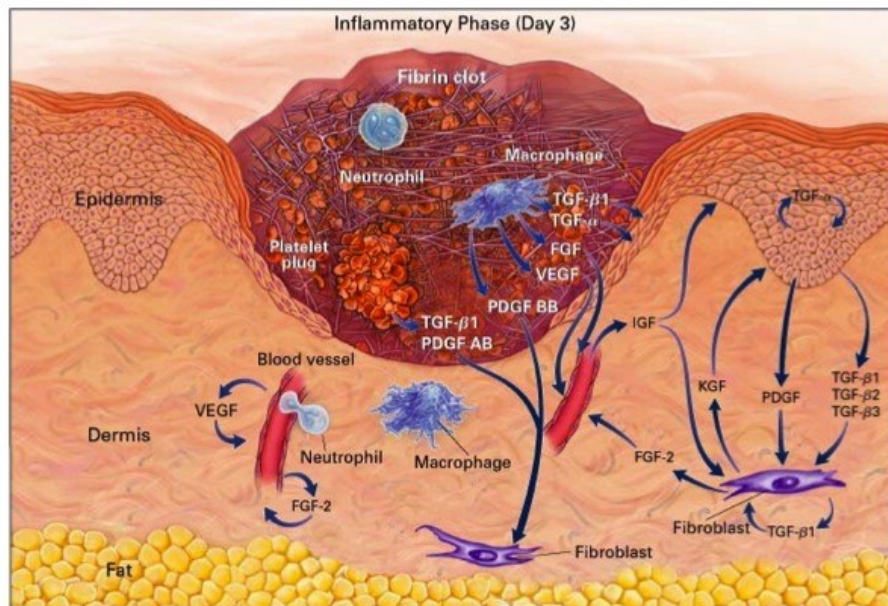


Abbildung 6: Darstellung des kutanen Wundheilungsprozesses. Frühe Phase der Wundheilung: Zunächst Bildung eines Fibrinpfropfes zur Stopfung des Blutflusses. Anlockung von inflammatorischen Zellen (Makrophagen, Neutrophile) durch die aktivierten Thrombozyten. Diese produzieren Wachstumsfaktoren und Zytokine. Fibroblasten wandern vom Wundrand ein. (Singer und Clark 1999)

Neben der Aktivierung der Komplementkaskaden erhöhen Anaphylatoxine die Gefäßpermeabilität. Neutrophile und Monozyten werden zum geschädigten Areal gelockt. Zusätzlich stimulieren diese die Sekretion von Histamin und Leukotrienen auf Mastzellen. 50% der vorherrschenden Zellen am Tag 1 der Verletzung bestehen aus Neutrophilen (Engelhardt et al. 1998). Sie dienen vornehmlich der Reinigung der Wunde durch u.a. Beseitigung von Bakterien und Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die wiederum Monozyten anlocken. Die Monozyten infiltrieren die Wunde und werden zu aktivierten Makrophagen.

Makrophagen sezernieren u.a. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1), TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  sowie PDGF und VEGF und initiieren die Bildung von Granulationsgewebe durch Anlockung von Fibroblasten (Sunderkotter et al. 1994). Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle bei der Bildung von

Granulationsgewebe, denn Makrophagen-dezimierter Tiere zeigen eine gestörte Wundheilung (Leibovich und Ross 1975).

Lymphozyten wandern ebenfalls in die Wunde und sind am Tag 14 die dominierende Zellzahl (Gillitzer und Goebeler 2001). Neben ihrer Rolle als Antigen-präsentierende Zellen im Immunsystem, sezernieren sie Wachstumsfaktoren, welche zur Remodellierung in der später Phase der Wundheilung beitragen (Blotnick et al. 1994).

### 2.3.2 Proliferation

Die Reepithelisierung beginnt bereits einige Stunden nach der Verletzung. Neues Stroma, auch Granulationsgewebe genannt, dringt bereits nach vier Tagen vom Wundrand in die Wunde ein. Gleichzeitig infiltrieren Makrophagen, Fibroblasten und Blutgefäße das Areal (Hunt 1980). Makrophagen stellen die für Angiogenese und Fibroblastenbildung benötigten Wachstumsfaktoren zu Verfügung (Abbildung 7).

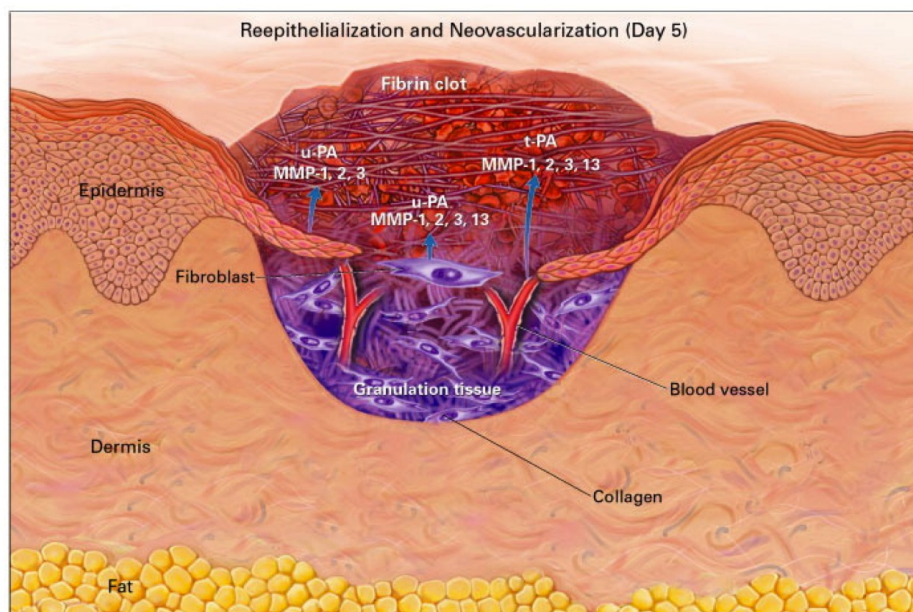


Abbildung 7: Darstellung der späten Wundheilungsphase: Bildung und Umwandlung des Granulationsgewebes durch Fibroblasten und Matrix-Metalloprotease. Neovaskularisation zur Versorgung des neu gebildeten Gewebes. (Singer und Clark 1999).

Vor allem PDGF (Heldin und Westermarck 1999) und TFG- $\beta$ 1 (Roberts und Sporn 1996) in Verbindung mit ECM-Molekülen veranlassen Fibroblasten zu proliferieren, Integrinrezeptoren zu präsentieren und in die Wunde zu migrieren (Gray

et al. 1993, Xu und Clark 1996). Fibroblasten haben die Aufgabe, die Synthese der ECM durch Bereitstellung von Kollagenase und Fibronektin einzuleiten. Gemeinsam mit neu einsprossenden Blutgefäßen und Makrophagen wird die ECM in Granulationsgewebe umgebaut (Welch et al. 1990, Clark et al. 1995). Sobald eine ausreichende Menge Granulationsgewebe gebildet wird, stoppt die Proliferation von Fibroblasten (Desmouliere et al. 1995).

Die Bildung neuer Blutgefäße ist notwendig, um das neu entstandene Granulationsgewebe aufrecht zu erhalten. Basic Growth Factor induziert die Angiogenese in den ersten drei Tagen der Wundheilung, während VEGF vor allem zwischen Tag 4 und 7 während der Bildung des Granulationsgewebes exprimiert wird (Nissen et al. 1998).

### **2.3.3 Remodellierung**

Zwei Wochen nach der Verletzung wandeln sich einige Fibroblasten in Myofibroblasten um, charakterisiert durch lange Bündel von Aktin-Mikrofilamenten (Welch et al. 1990). Diese Umwandlung erlaubt den Fibroblasten, sich zu kontrahieren und damit die Wundfläche zu verkleinern. Im weiteren Verlauf verringert sich die Anzahl von Fibroblasten durch Apoptose oder Phagozytose. Auch bildet sich eine Vielzahl der Blutgefäße zurück.

Die Bildung von Kollagen währen der Umwandlung der ECM in Narbengewebe setzt kontinuierlichen Auf- und Abbau von Kollagen voraus. Die Degradierung von Kollagen wird durch eine Vielzahl proeolytischer Enzyme verursacht, vor allem Matrix-Metalloprotease sezerniert von Makrophagen, Epidermalen Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten (Mignatti et al. 1996).



### 3 ZIELE DER ARBEIT

Hauttransplantate sind weitverbreitet in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie, um Wunden oder Haut- und Gewebeverletzungen durch Traumata oder Verbrennungen zu decken. Aufgrund von ischämischer Nekrose durch ungenügende Revaskularisation kommt es häufig zum Absterben des Transplantates. Die Familie der Vascular Growth Factors gehört zu den Hauptmodulatoren der Angiogenese. Induziert durch Hypoxie stellen sie eine gute Möglichkeit der Revaskularisation von Lappenplastiken dar. Jedoch wird ihr Verdienst kontrovers diskutiert. Einige Kritiker sehen in der therapeutischen Anwendung von VEGF ein Risiko der Entstehung pathologischen Gefäßwachstums.

In vorangegangenen Studien ist eine Verteilung von VEGF außerhalb des Zielgewebes bisher nicht nachgewiesen worden. Weiterhin stellt sich heraus, dass VEGF-DNA mittels Nukleofektion in die autologen Fibroblasten eingeschleust werden kann. Basierend auf diesen Informationen soll in dieser Arbeit die VEGF-Expression und die histomorphometrische Untersuchung der Gefäßausbildung gemäß Injektionszeitpunkt im subkutanen und muskulären Gewebe untersucht werden. Die Ermittlung der Expression von VEGF erfolgt mittels Real-time PCR. Histologisch werden die gebildeten Gefäße mittels CD31- und  $\alpha$ SMA-Antikörper angefärbt.

Vor diesem Hintergrund ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Der Applikationszeitpunkt hat Einfluss auf die Effektivität der Gentherapie.
2. Durch die Injektion eines Hypoxie-induzierten Vektors gegenüber den unveränderten Zellen wird die VEGF-Expression und somit die Kapillaraussprossung erhöht.
3. Die Effektivität der Therapie mit pRTP801-VEGF165 zeigt sich vor allem in der verstärkten Vaskularisation im subkutanen Gewebereich.

#### 4 VEGF-TRANSFER BASED ON GENE-MODIFIED FIBROBLASTS USING A HYPOXIA-INDUCED VECTOR TO MODULATE NEOANGIOGENESIS IN ISCHAEMIC REGIONS OF MYO-CUTANEOUS TRANSPLANTS

C. Eggers, J. Müller, S. Schultze-Mosgau

*Department of Oral and Cranio-Maxillofacial Surgery/Plastic Surgery, Friedrich-Schiller University, Jena, Germany*

##### ABSTRACT

The effect of a hypoxia-inducible VEGF-expressing plasmid on wound healing in an ischaemic hind leg rat model was evaluated in this study. 180 Wistar rats were assigned randomly to three groups. After ligation of the femoral artery, group 1 received pRTP801-VEGF<sub>165</sub>, group 2 untransfected fibroblasts, group 3 saline; injection was into the subcutaneous tissue and proximal and distal to the artery ligation. Biopsy specimens were obtained on days 3, 5, 7, and 14 after implementation. VEGF transgene expression, vessel architecture, the amount and total area of vessel formation were investigated. Results showed a significantly higher level of VEGF protein expression in group 1 compared to group 2 ( $P \leq 0.001$ ) throughout the investigational period. Group 1 exhibited a significant growth of CD31-positive blood vessels in the subcutaneous tissue on day 14 compared to groups 2 and 3 ( $P \leq 0.001$ ) (group 1,  $62.20 \pm 1.92$ ; group 2,  $20.60 \pm 1.67$ ; group 3,  $12.40 \pm 1.14$ ).  $\alpha$ SMA-positive staining also showed significant vessel growth in group 1 on day 5 (group 1,  $27.00 \pm 1.87$ ; group 2,  $7.20 \pm 1.48$ ; group 3,  $10.00 \pm 1.72$ ). These results were confirmed in the distal muscle tissue. No significant results were obtained for the proximal muscle tissue. The subcutaneous application of pRTP801-VEGF<sub>165</sub> showed a long-lasting effect, with an increased expression of VEGF over the entire observation period. It appears that the use of fibroblasts transfected with VEGF is a promising way to increase early angiogenesis in ischaemic tissue.

**Key words:** gene transfer, VEGF, angiogenesis, wound healing

## INTRODUCTION

Wound healing is an essential physiological process with the aim of total recovery. To this end, an abundant blood supply is necessary to meet the enormous demand of debridement, fibroblast proliferation, extracellular matrix synthesis, and epithelialization<sup>1,2</sup>. The induction of localized angiogenesis is of particular interest in the field of plastic and reconstructive surgery to reduce graft loss caused by local ischaemia and necrosis.

Angiogenesis is a complex, continuous process that is controlled by a variety of factors. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent direct angiogenic factor that stimulates in vitro endothelial cell migration and activation and in vivo angiogenesis<sup>3</sup>. The availability of oxygen is the strongest regulator of VEGF expression; by decreasing the oxygen partial pressure, the mRNA expression of the gene increases<sup>4</sup>. Uncontrolled expression of VEGF causes unrestrained angiogenesis. Tumour growth relies on the formation of new blood vessels, and in this process, several angiogenic growth factors, including VEGF, are induced<sup>5,6</sup>. Due to the potential side effects, therapeutic angiogenesis gene therapy should be regulated<sup>7</sup>. The positive effect of in vivo neoangiogenesis stimulation by ex vivo VEGF-transduced fibroblasts has been investigated in previous studies. No potential side effects were detected<sup>8,9</sup>. Lee et al. examined the potential of a hypoxia-inducible pRTP801-VEGF plasmid and determined strong promoter activity and induction under hypoxia<sup>10</sup>.

Sufficient vascularization of graft tissue and the graft bed is required for a high rate of engraftment. Several pre-clinical investigations have shown stimulation of perfusion using VEGF. Schultze-Mosgau et al. showed that a reduction in the amount and diameter of capillary structures in pre-irradiated graft tissues is the major cause of graft rejection<sup>11</sup>. With daily topical applications of recombinant endothelial growth factor (rVEGF) to irradiated tissue, an improvement in neovascularization in free vascular graft tissue was detected<sup>12</sup>. Padubidri et al. detected an increased survival rate in an epigastric flap model after injections of VEGF. Histological examination showed that the success was a result of increased capillary concentration<sup>13</sup>.

In this study, we investigated the effects of hypoxia-inducible VEGF gene transfer on neovascularization, VEGF<sub>165</sub> overexpression, and the amount of new blood vessel formation after subcutaneous and intramuscular injections in a rat hind limb model over a period of 14 days, using the RTP801-VEGF<sub>165</sub> promoter.



## **METHODS**

### **Harvest of oral mucosa and in vitro fibroblast culture**

A total of 180 male, 3-month-old Wistar rats (weight 500 g; Institute of Laboratory Animal Science, University of Jena, Thuringia, Germany) were used for this study. The animals were kept alone in Makrolon type III cages (Tecniplast, Varese, Italy) at a temperature of  $22 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , 55% humidity with a 12-h circadian rhythm. The animals received a standard pellet diet (No. 1320; Altromin, Lage, Germany) and fresh water ad libitum. The study was approved by the local authorities (No. 02–002/09). The rats were anaesthetized using techniques described previously<sup>8</sup>. Oral mucosa biopsies measuring  $0.5 \times 1 \text{ cm}^2$  were obtained from the dorso-lateral surface of the tongue of each animal, using previously described techniques<sup>14</sup>. The isolation of the fibroblasts was ensured by the technique of Mueller et al.<sup>8</sup>.

### **Transfection**

The first passage fibroblasts were divided randomly into three groups. The cells in group 1 ( $n = 60$ ) were transfected with hypoxia-induced pRTP801-VEGF<sub>165</sub> and cultured over another passage of 24 h. The untransfected cells of group 2 ( $n = 60$ ) were cultured over another passage of 24 h, and group 3 ( $n = 60$ ) had no cells injected. The pRTP801-VEGF<sub>165</sub> plasmid was first investigated by Lee et al.<sup>10</sup> and was kindly provided for this study. The transfections were carried out as described previously<sup>9</sup>. In brief,  $5 \times 10^7$  fibroblasts were resuspended in 100  $\mu\text{l}$  of Nucleofector buffer (Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Fibroblasts; Amaxa) and nucleofected (Nucleofector I, protocol A024; Amaxa) with 2  $\mu\text{g}$  of the VEGF plasmid. The transfection efficiency was monitored as described previously<sup>8</sup>. Signals were acquired for the forward scatter, side scatter, and the FL1-H channels, excited by the argon laser (488 nm) using standards. A minimum of 10,000 events were acquired per sample. The means and standard deviations (SD) were calculated.

### **In vivo experiments**

Under anaesthesia as described previously<sup>8</sup>, second-passage fibroblasts, either pRTP801-VEGF<sub>165</sub> (group 1) or untransfected fibroblasts (group 2), were

injected at a concentration of  $5 \times 10^7$  cells/ml with simultaneous ligation of the femoral artery to provoke hypoxic tissue; group 3 were injected with saline at the time of ligation. The injection was done in the subcutaneous tissue and proximal and distal to the femoral artery ligation. All animals received their own autogenous cells. On days 3, 5, 7, and 14 after surgery, five animals in each group were sacrificed and biopsies were obtained from the area around the injection.

## **Histology**

The tissue specimens were imbedded in Tissue Tek (Sakura Finetek Europe BV, Zoeterwoude, Netherlands) and cut vertically (10  $\mu$ m) using a microtome. Immunohistochemistry was used to compare new blood vessel formation between the different groups. To avoid unspecified antibody binding, all samples were incubated with 5% rabbit serum (DAKO, Hamburg, Germany) for 30 min. The detection of CD31 was performed with a primary antibody, polyclonal goat VEGF IgG (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), at 4°C for 24 h. The biotinylated polyclonal rabbit anti-goat antibody (DAKO) was used as the secondary antibody at a dilution of 1:100 in Real Antibody Diluent (DAKO) for 60 min at room temperature (RT). To visualize alpha smooth muscle actin (alphaSMA), a monoclonal mouse anti-human SMA (DAKO) was used as the primary antibody, with incubation at 4°C for 24 h. Then, the biotinylated rabbit anti-mouse IgG (DAKO) was used at a dilution of 1:100 for 60 min at RT. Three samples per microscope slide were taken, including one negative control (incubation as described, omitting the primary antibody). To stain the secondary antibody, the samples were incubated with streptavidin–horseradish peroxidase (HRP) complex (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD, USA) at a dilution of 1:100 for 30 min at RT, followed by incubation with DAB-chromogen (DAKO) for 10 min at RT. To improve the contrast, the nuclei were counterstained with hemalaun.

## **Histomorphometry**

A randomized, systematic sub-sampling method was used<sup>15</sup>. Three randomly selected visual fields per section were digitized at 400× magnification (high-power field, HPF) (Axiovision Zeiss, Oberkochen, Germany). In accordance with Spanholtz et al., each structure with a central lumen surrounded by a continuous layer of CD31-

or alphaSMA-positive cells was counted as a vessel or arteriole<sup>16</sup>. For further validation of the data, the ratio of the total luminal area to the total area of the visual field (as a percentage) was determined using GIMP (GNU Image Manipulation Program, UK).

### **Real-time polymerase chain reaction (PCR)**

A real-time PCR based on SYBR Green (Qiagen, Düsseldorf, Germany) was used to measure the gene expression in the tissue to be examined. The frozen samples were mechanically disturbed for separation in order to determine the amount of RNA using PUREZol RNA Isolation Reagent (Bio-Rad, Munich, Germany). The RNA concentration was defined spectrophotometrically (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). The mRNA was quantified using the Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) and Rotor-Gene Q Cyclor System (Qiagen). For statistical evaluations, the comparative cycle threshold (Ct) method was used (delta–delta–Ct).

### **Statistical analysis**

All data were recorded as the mean value  $\pm$  SD. Graphical descriptions were represented with a bar plot. Comparisons between the groups at different time points and among themselves were made using an analysis of variance (ANOVA) test. The *P*-values were adapted for multiple testing, in accordance with the method of Bonferroni, by multiplying each value with the number of confirmatory tests performed ( $n = 3$ ). *P*-values of  $<0.05$  were considered significant. All calculations were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, version 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

## **RESULTS**

### **pRTP801-VEGF<sub>165</sub> expression**

To examine whether hypoxia-inducible VEGF<sub>165</sub> expression benefits revascularization in early grafts and improves graft survival and function over time, pRTP801-VEGF<sub>165</sub> transfected or non-transfected cells were transplanted. We used a real-time PCR to quantify the expression of VEGF in the hypoxic tissues of the different groups over an investigational period of 14 days.

In the subcutaneous injection area, group 1 (pRTP801-VEGF<sub>165</sub>) and group 2 (untransfected fibroblasts) showed similar transcription rates at 3 days after ligation of the femoral artery. The expression rates in both groups were similar up to postoperative day 7. Day 14 biopsies from the pRTP801-VEGF<sub>165</sub> transfected group showed a higher gene expression rate compared with the day 14 biopsies from the non-transfected group ( $P \leq 0.007$ ) (Fig. 1).

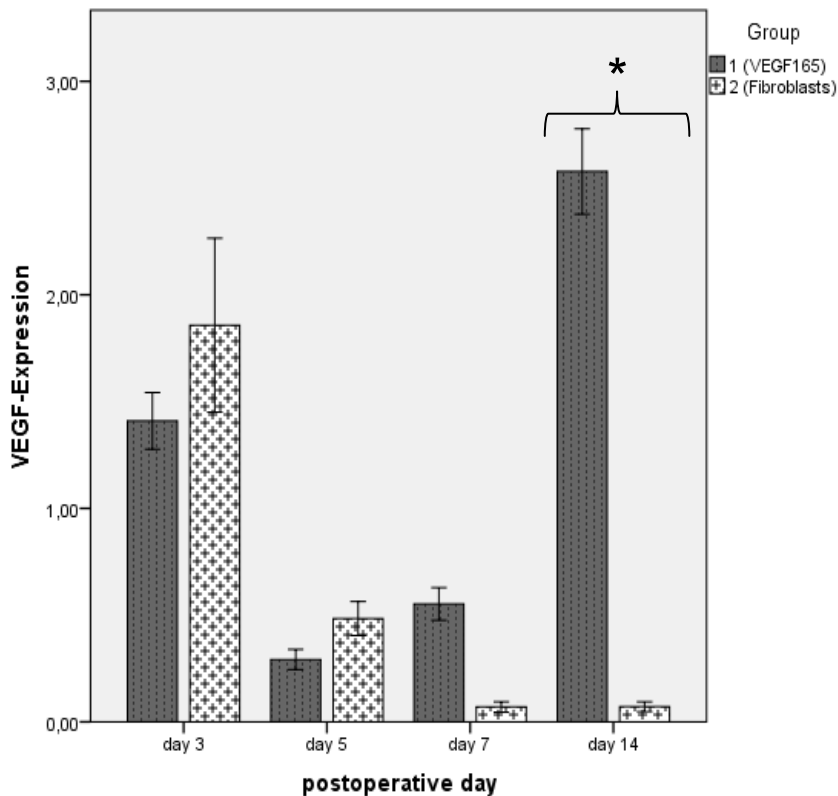


FIG. 1: postoperative VEGF-expression in the subcutaneous hypoxic tissue. The bars show means and the error bars indicate SD, stars (\*) mark significant expression differences

In the muscular application area distal to the femoral artery ligation, group 1 showed significant VEGF gene expression on day 7 ( $P \leq 0.001$ ) and day 14 ( $P \leq 0.006$ ) compared with group 2 (Fig. 2). In the proximal muscular area, no significant differences between group 1 and group 2 were detected (results not shown).

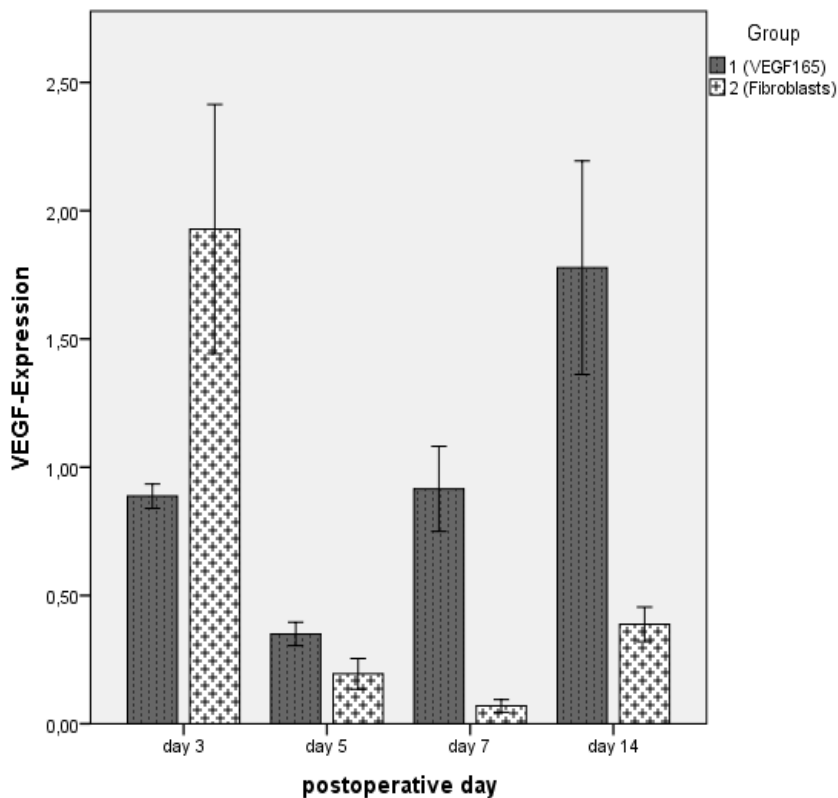


FIG. 2: postoperative VEGF-expression in the distally muscular hypoxic tissue. The bars show means and the error bars indicate SD, stars (\*) mark significant expression differences

### Neovascularization of hypoxic tissue

We investigated the effect of VEGF overexpression on the neovascularization of tissue with artificially induced hypoxia. For the detection of potential erroneous vessel formation, the results were compared with healthy control tissues. The verifiable CD31- and alphaSMA-positive vessels showed different results in terms of the application time, region, and group. Visual assessment showed that group 1 (pRTP801-VEGF<sub>165</sub>) developed the most new blood vessels compared with group 2 (untransfected fibroblasts) and group 3 (saline) (Figs. 3 and 4). Some blood vessels contained erythrocytes in their lumens. CD31-positive blood vessels represent all the vessels detected; alphaSMA is only stained in smooth muscle.

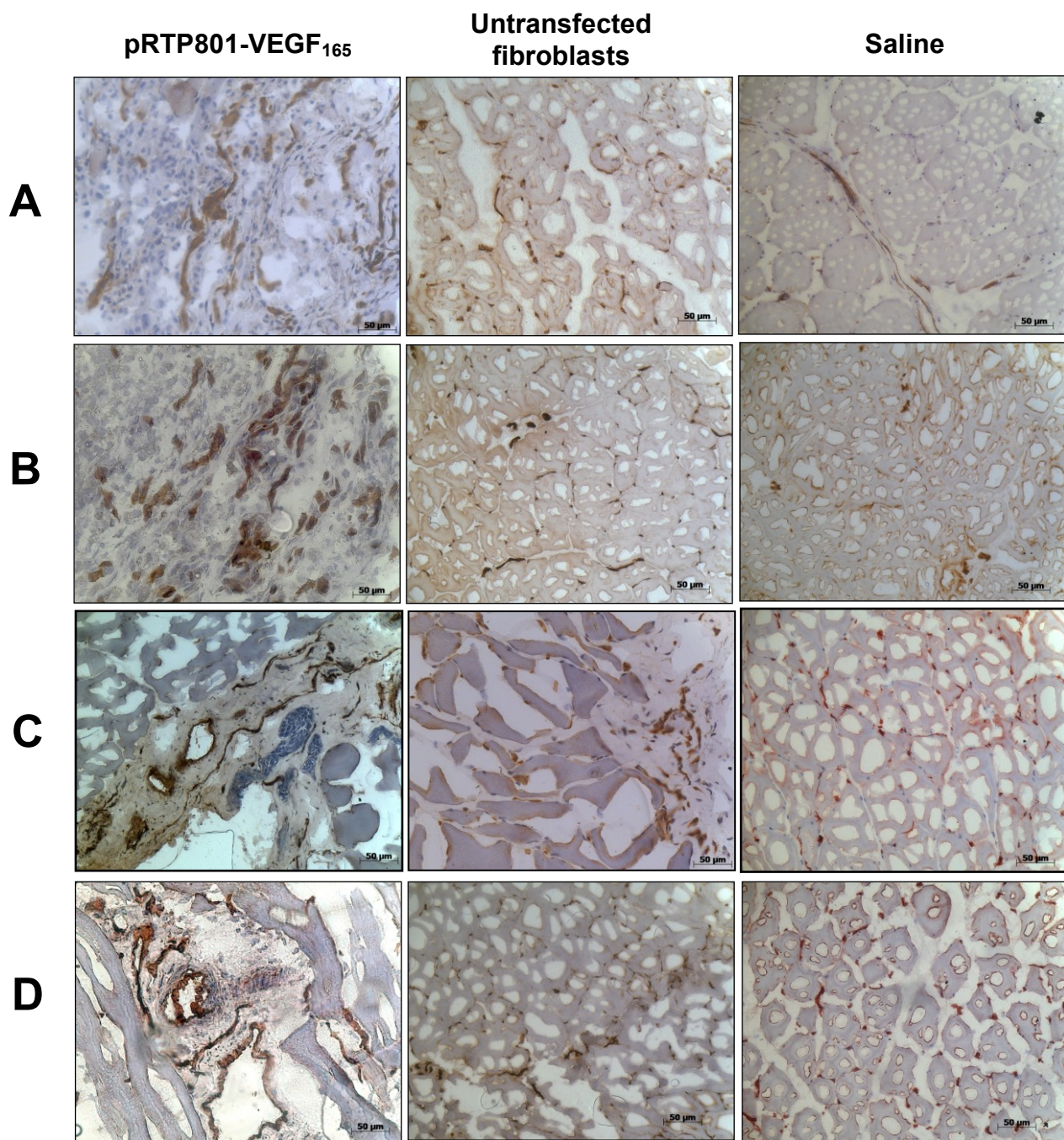


FIG. 3: Immunohistochemical illustration of CD31-positive blood vessels. Original magnification x400. **A:** Day 3 p.o. **B:** Day 5 p.o. **C:** Day 7 p.o. **D:** Day 14 p.o.



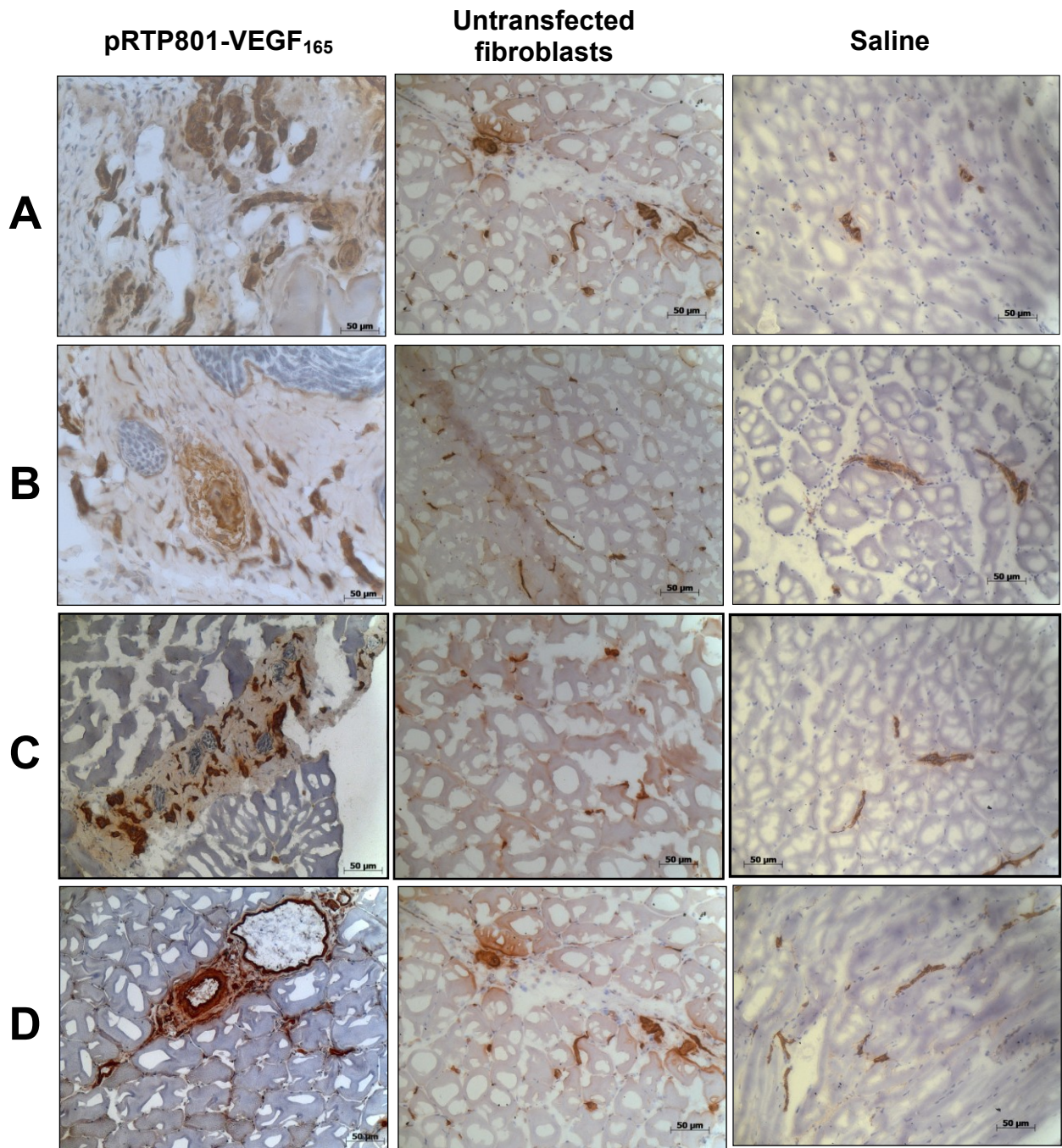


FIG. 4: Immunohistochemical illustration of alphaSMA-positive blood vessels. Original magnification x400. **A:** Day 3 p.o. **B:** Day 5 p.o. **C:** Day 7 p.o. **D:** Day 14 p.o.

In the subcutaneous injection area, group 1 showed a significant growth of CD31-positive blood vessels on day 5 ( $P \leq 0.05$ ) (group 1,  $53.20 \pm 1.64$ ; group 2,  $17.80 \pm 1.89$ ; group 3,  $10.80 \pm 1.95$ ) and day 14 ( $P \leq 0.05$ ) (group 1,  $62.20 \pm 1.92$ ; group 2,  $20.60 \pm 1.67$ ; group 3,  $12.40 \pm 1.14$ ) compared with groups 2 and 3. The vascular lumen was significantly different on day 3 ( $P \leq 0.023$ ) and day 14 ( $P \leq 0.001$ ). The alpha-SMA-positive blood vessels showed significant growth on day 5 (group 1,  $27.00 \pm 1.87$ ; group 2,  $7.20 \pm 1.48$ ; group 3,  $10.00 \pm 1.73$ ) and on day 7 (group 1,  $53.80 \pm 1.64$ ; group 2,  $15.80 \pm 1.64$ ; group 3,  $9.40 \pm 1.14$ ); the vascular

lumen showed significant differences between group 1 and groups 2 and 3 on day 5.

In the distal muscular application area, results for CD-31 positive blood vessels were significant on day 5 (group 1,  $53.80 \pm 1.68$ ; group 2,  $33.80 \pm 1.88$ ; group 3,  $8.40 \pm 1.30$ ) and on day 7 (group 1,  $53.80 \pm 1.64$ ; group 2,  $15.80 \pm 1.64$ ; group 3,  $9.40 \pm 1.14$ ); the vascular lumen of CD-31-positive blood vessels of group 1 showed significant differences on day 5 compared with groups 2 and 3 ( $P \leq 0.001$ ). The alpha-SMA-positive blood vessels showed different results

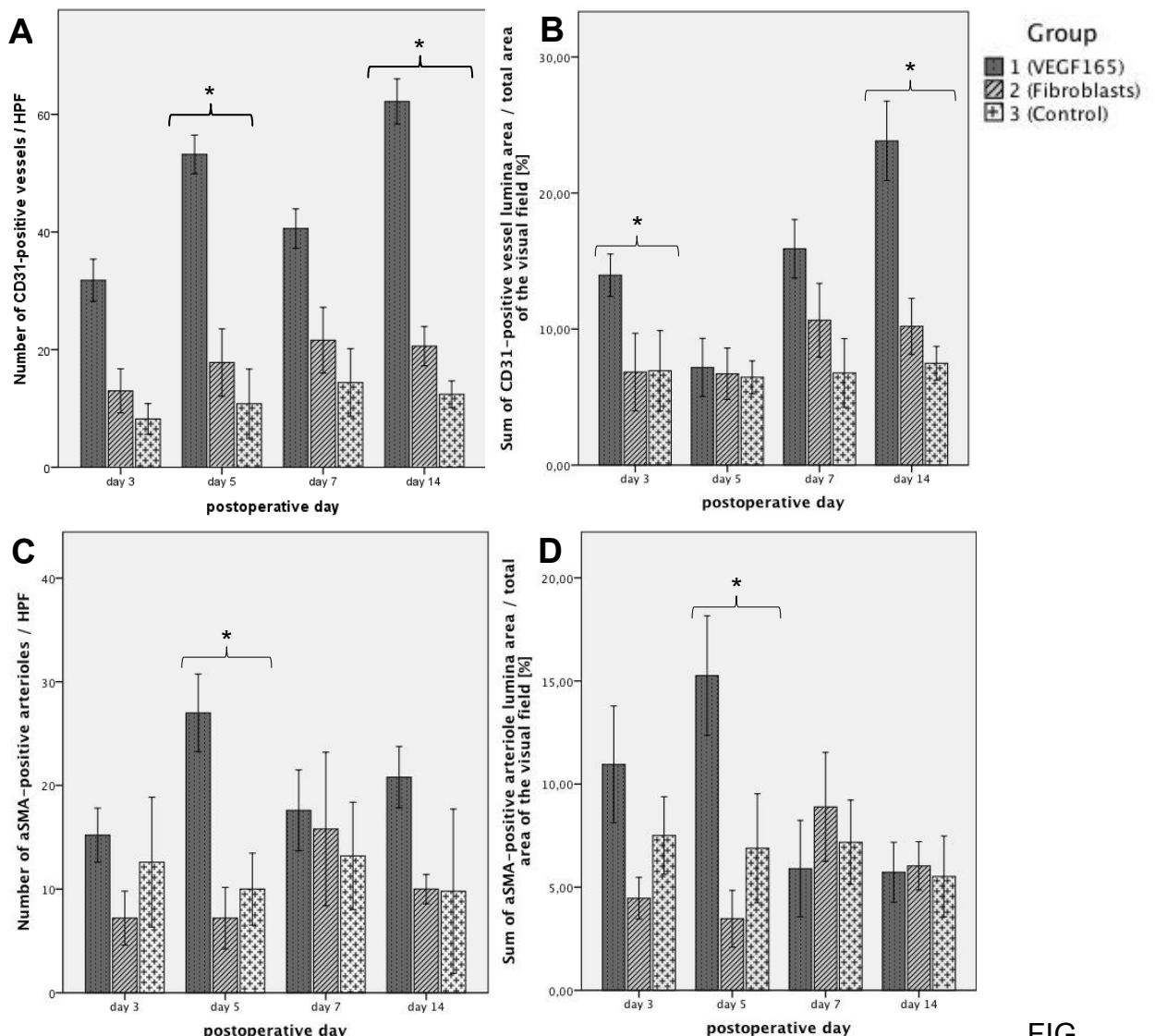


FIG.

5: Histomorphometric assessment of the neovascularization in the subcutaneous application region. The bars show means and the error bars indicate SD, stars (\*) mark significant expression differences



Significance with regard to the number of alpha-SMA-positive vessels was detected on day 3 (group 1,  $26.00 \pm 1.81$ ; group 2,  $10.80 \pm 1.17$ ; group 3,  $10.40 \pm 1.82$ ) and day 7 (group 1,  $25.80 \pm 1.70$ ; group 2,  $9.70 \pm 2.07$ ; group 3,  $8.60 \pm 2.03$ ). No significant differences in results were found in respect to the vascular lumen.

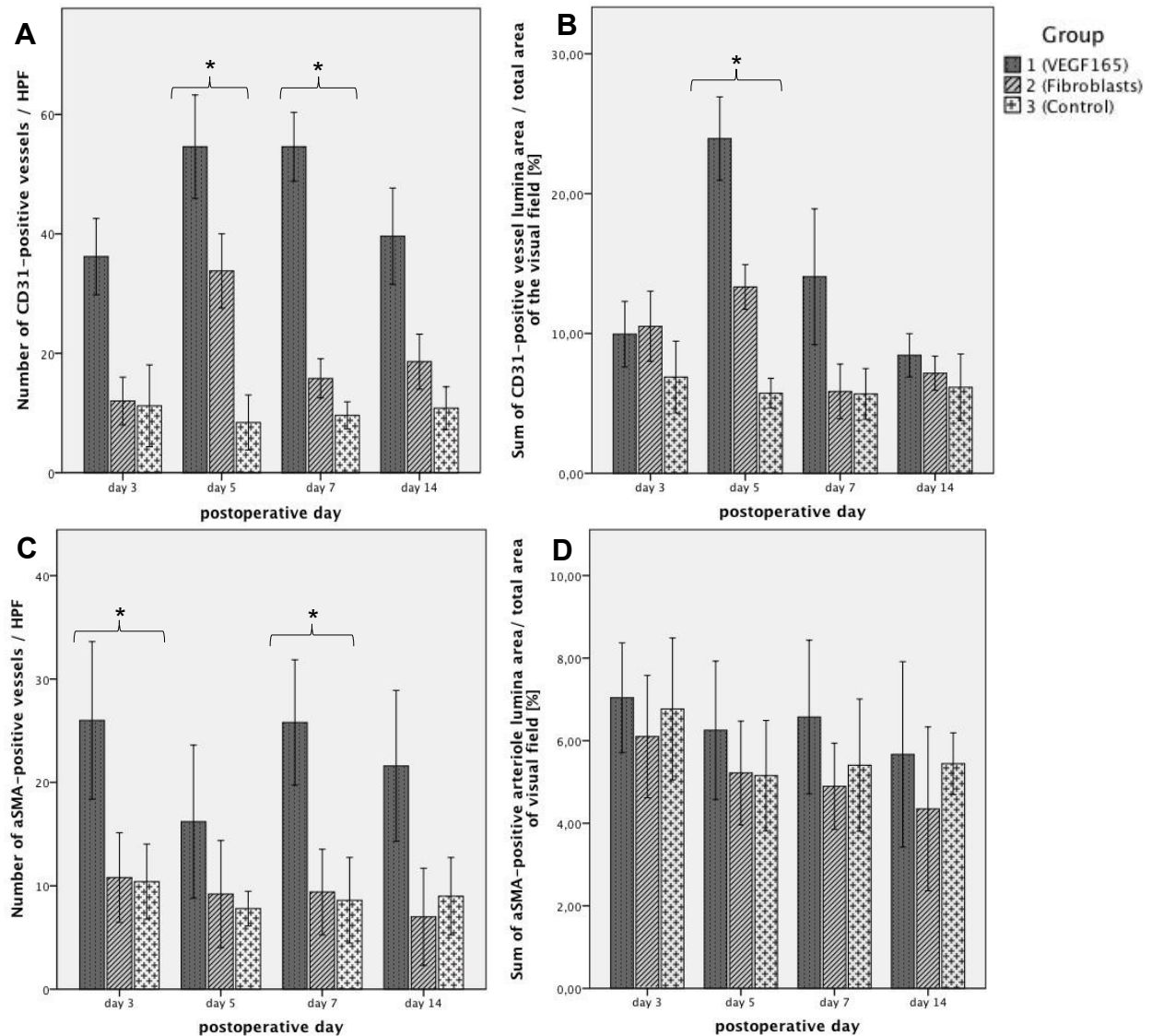


FIG. 6: Histomorphometric assessment of the neovascularization in the distal muscular application region. The bars show means and the error bars indicate SD, stars (\*) mark significant expression differences.

In the proximal muscular application region no significances were detected. The amount of new blood vessels showed a maximum for CD31-positive neovascularization on day 5. Regarding the alpha-SMA-positive vessel formation, the maximum was observed on day 3. Similar findings were obtained for the luminal area/total area ratios (results not shown).

## DISCUSSION

The development of blood vessels in in-situ differentiating endothelial cells is called vasculogenesis, and the sprouting of new blood vessels from pre-existing vessels is termed angiogenesis or neovascularization<sup>17</sup>. Angiogenesis is an essential element of tissue repair and can be influenced by many factors, including hypoxia, growth factors, matrix components, and others<sup>3,18–21</sup>. Uncontrolled angiogenesis leads to tumour growth, and inadequate blood vessel formation causes a shortage of oxygen and essential nutrients<sup>1</sup>. The balance between pro-angiogenic and anti-angiogenic growth factors continuously controls angiogenesis.

One of the most specific and critical signalling molecules of angiogenesis is VEGF. The expression of VEGF increases in reaction to hypoxia, and VEGF induces cell migration and endothelial cell proliferation and inhibits apoptosis<sup>22,23</sup>. VEGF has been shown to be a critical factor for tumour-associated neovascularization and a stimulating element for diseases such as arthritis, diabetes, macular degeneration, and retinopathies<sup>1,24–27</sup>. The therapeutic opportunities for pro-angiogenic therapies in cardiac ischaemia and accelerated wound healing are of great interest. Because of the severe side effects associated with uncontrolled, constitutive overexpression of VEGF, the therapeutic use of growth factors is limited.

We used a hypoxia-inducible VEGF-expressing plasmid, pRTP801-VEGF<sub>165</sub>, which can promote angiogenesis and improve wound healing and flap engraftment<sup>10,28</sup>. We demonstrated that hypoxia-induced VEGF expression systems using the RTP801 promoter could be an efficient treatment for hypoxia-induced wound healing disorders. Using the hypoxia-induced VEGF plasmid, higher levels of VEGF secretion were found compared to those in untransfected fibroblasts under hypoxic conditions over a period of 14 days after plasmid injection.

The loss of grafts because of ischaemia is one of the greatest risk factors in plastic and reconstructive surgery<sup>29,30</sup>. The positive effect of VEGF on angiogenesis in terms of skin grafts has been the focus of many investigations. Zhang et al. showed an increased graft survival rate and increased functionality of the grafts because of VEGF (Zhang et al. 2003). The VEGF-induced neovascularization enabled the elevation of more voluminous flaps and accelerated their engraftment. The growth factor is responsible for vasodilatation and oedema. This is important for the early serum imbibition and inosculation during engraftment<sup>3,31–35</sup>. Compared with

cutaneous grafts, the transfer of nutrition through diffusion is not sufficient in myocutaneous grafts, and efficient blood flow is essential for survival<sup>36</sup>.

Our investigation was based on the above-mentioned facts. To our knowledge this is the first investigation of the vascular compensatory mechanisms in the ischaemic model of the hind leg of Wistar rats under the influence of pRTP801-VEGF<sub>165</sub> transfected fibroblasts. With a total of 180 Wistar rats, this study included more animals than in similar experiments<sup>16,37</sup>. Gonçalves et al. demonstrated a prolonged transgene expression through fibroblasts compared with myoblasts<sup>38</sup>. The advantage of ex vivo transfection is based on the production of homogeneous cell populations and on controlling the amount of cells<sup>39</sup>. Our previous results prove the success of this method<sup>8,9</sup>. It could be shown that either the transfected fibroblasts or the growth factor spread systemically<sup>8</sup>.

The physiological arrangement of the vessels in skin and muscle suggest the hypothesis that more blood vessels occur in the subcutaneous investigational area than in biopsies of the musculus gracilis. Pettersson et al. demonstrated a distinct and sustainable VEGF-induced angiogenesis in the skin compared with the muscle<sup>40</sup>. This study confirms those results. More vessels were found to exist in the subcutaneous area and they occupied a greater area compared to those in the muscular investigational area.

With regard to the angiogenesis in the distal and proximal muscular areas, decreased angiogenesis was expected because of the ischaemia after the femoral artery ligation. Other groups have shown that the distal parts of the graft are exposed to more intensive ischaemia compared with the proximal parts. The analysis of VEGF expression showed that mild ischaemia leads to a massive increase in the VEGF concentration, but that massive ischaemia does not lead to an increase in the VEGF concentration<sup>3,41</sup>. In the present study, the number of blood vessels and their area showed more significant growth in the distal muscular area compared to the proximal muscular area. Although the blood supply of the artery perforates the proximal part of the muscle, no difference in oxygen enrichment appears to exist. According to these results, the conditions for the ischemic gradients needed to compare the results to a myocutaneous graft are not fulfilled.

Hypoxia and a high VEGF concentration induce vasodilatation after ligation of the femoral artery<sup>42,43</sup>. The maximal area of the vessels is used for the transport of blood towards the hypoxic tissue. The stimulus is provided for angiogenesis to build

new blood vessels due to the VEGF gradient. The establishment of a collateral circulation decreases the pressure gradient and improves the oxygen supply. One week after ligation of the artery, the blood flow slowly recovers<sup>44,45</sup>. Because of the increasing aerobic conditions, the endogenous hypoxic-induced VEGF concentrations decline<sup>46</sup>. The different levels of expression of the various VEGF receptors (VEGFR1 and VEGFR2) play a regulatory role. The pro-angiogenic VEGFR2 decreases by up to 80% at 3 days after the start of ischaemia, and the anti-angiogenic VEGFR1 increases at 10 days after ischaemia<sup>47,48</sup>. The compensatory mechanism is determined when a few larger vessels substitute the blood flow of the femoral artery<sup>49</sup>. Thompson et al. showed that the vessel content of simple, incised mouse wounds was increased to a maximum on days 5 and 6<sup>2</sup>. The pRTP801-VEGF<sub>165</sub> transfected fibroblasts showed an increased effect with respect to neovascularization compared with endogenously produced VEGF, especially on day 5.

In conclusion, several previous investigators have demonstrated the therapeutic potential of VEGF for wound healing, engraftment, cardiac function, and other functions. Using gene-modified fibroblasts, the continuous expression of VEGF in hypoxic tissue was detected. We demonstrated the expression of VEGF over a period of 14 days, and our results are in agreement with those of previous investigators. We investigated the discrepancy between VEGF expression and blood vessel formation. VEGF expression was the highest on day 14, but the histomorphometric evaluation showed a maximum number of blood vessels on day 5 and on day 14. It is necessary to investigate the development of VEGF expression and neovascularization over a period longer than 2 weeks in order to determine the long-term development and functionality of the hypoxia-induced pRTP801-VEGF<sub>165</sub> plasmid.

**FUNDING**

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

**COMPETING INTERESTS**

None declared.

**ETHICAL APPROVAL**

Thuringian State Agency for Food Safety and Consumer Protection (Reg.-Nr. 02–002/09).

**PATIENT CONSENT**

Not required.

**REFERENCES**

1. Carmeliet P. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 710–20.
2. Thompson WD, Harvey JA, Kazmi MA, Stout AJ. Fibrinolysis and angiogenesis in wound healing. *J Pathol* 1991; 165: 311–8.
3. Zhang F, Lei MP, Oswald TM, Pang Y, Blain B, Cai ZW, Lineaweaver WC. The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischaemic skin wounds. *Br J Plast Surg* 2003; 56: 334–41.
4. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 1994; 71: 374–9.
5. Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM. Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy. *Gene Ther* 2000; 7: 493–8.
6. Kim HA, Mahato RI, Lee M. Hypoxia-specific gene expression for ischemic disease gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 614–50.
7. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932–6.
8. Mueller CK, Thorwarth M, Schultze-Mosgau S. Transgenic overexpression of VEGF164 enhances topical neoangiogenesis without detectable local or systemic side effects. *Ann Plast Surg* 2010; 65: 85–8.
9. Mueller CK, Thorwarth MW, Schultze-Mosgau S. Angiogenic gene-modified fibroblasts for induction of localized angiogenesis. *J Surg Res* 2010; 160: 340–48.
10. Lee M, Bikram M, Oh S, Bull DA, Kim SW. Sp1-dependent regulation of the RTP801 promoter and its application to hypoxia-inducible VEGF plasmid for ischemic disease. *Pharm Res* 2004; 21: 736–41.

11. Schultze-Mosgau S, Grabenbauer GG, Radespiel-Troger M, Worl J, Grabenbauer GG, Neukam FW. Vascularization in the transition area between free grafted soft tissues and pre-irradiated graft bed tissues following preoperative radiotherapy in the head and neck region. *Head Neck* 2002; 24: 42–51.
12. Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Rodel F, Amann K, Radespiel-Troger M, Grabenbauer GG. Improved free vascular graft survival in an irradiated surgical site following topical application of rVEGF. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 803–12.
13. Padubidri A, Browne E Jr. Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. *Ann Plast Surg* 1996; 37: 604–11.
14. Schultze-Mosgau S, Lee BK, Ries J, Amann K, Wiltfang J. In vitro cultured autologous pre-confluent oral keratinocytes for experimental prefabrication of oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 476–85.
15. Weibel ER. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. *J Microsc* 1989; 155: 393–403.
16. Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Stoeckelhuber BM, Kruger S, Wedel T, Aach T, Middeler G, Hellwig-Burgel T, Bader A, Krengel S, Muller OJ, Franz WM, Lindenmaier W, Machens HG. Timing and targeting of cell-based VEGF<sub>165</sub> gene expression in ischemic tissue. *J Surg Res* 2009; 151: 153–62.
17. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis—a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol* 2006; 44: 265–74.
18. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 464–78.
19. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653–60.
20. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 2004; 117: 3–32.
21. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73–91.
22. Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 154–65.
23. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 211–20.
24. Brekken RA, Overholser JP, Stastny VA, Waltenberger J, Minna JD, Thorpe PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Fik-

- 1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* 2000; 60: 5117–24.
25. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 1995; 26: 86–91.
26. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993; 53: 4727–35.
27. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473: 298–307.
28. Choi UH, Ha Y, Huang X, Park SR, Chung J, Hyun DK, Park H, Park HC, Kim SW, Lee M. Hypoxia-inducible expression of vascular endothelial growth factor for the treatment of spinal cord injury in a rat model. *J Neurosurg Spine* 2007; 7: 54–60.
29. Oswald P, Tilgner A, Schumann D. The influence of postoperative vessel occlusion on the viability of free microvascular skin-fat flaps and island flaps in rats. *J Reconstr Microsurg* 1988; 4: 403–7.
30. Schmelzeisen R, Ptok M, Schonweiler R, Hacki T, Neukam FW. (Schmelzeisen et al.). *Laryngorhinootologie* 1996; 75: 231–8.
31. Taub PJ, Marmur JD, Zhang WX, Senderoff D, Nhat PD, Phelps R, Urken ML, Silver L, Weinberg H. Locally administered vascular endothelial growth factor cDNA increases survival of ischemic experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102: 2033–9.
32. Kryger Z, Dogan T, Zhang F, Komorowska-Timek E, Shi DY, Cheng C, Lineaweaver WC, Buncke HJ. Effects of VEGF administration following ischemia on survival of the gracilis muscle flap in the rat. *Ann Plast Surg* 1999; 43: 172–8.
33. Gurunluoglu R, Meirer R, Shafighi M, Huemer GM, Yilmaz B, Piza-Katzer H. Gene therapy with adenovirus-mediated VEGF enhances skin flap prefabrication. *Microsurgery* 2005; 25: 433–41.
34. Zheng Y, Yi CG, He LJ, WangYM, Feng SQ, Liu D, Guo SZ. (Zheng et al.). *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2007; 45: 203–6.
35. Zhang F, Lineaweaver W. Acute and sustained effects of vascular endothelial growth factor on survival of flaps and skin grafts. *Ann Plast Surg* 2011; 66: 581–2.

36. Maeda M, Nakamura T, Fukui A, Koizumi M, Yamauchi T, Tamai S, Nagano-Tatsumi K, Haga S, Hashimoto K, Yamamoto H. The role of serum imbibition for skin grafts. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104: 2100–7.
37. Li R, Stewart DJ, von Schroeder HP, Mackinnon ES, Schemitsch EH. Effect of cell-based VEGF gene therapy on healing of a segmental bone defect. *J Orthop Res* 2009; 27: 8–14.
38. Gonçalves GA, Vassallo PF, dos Santos L, Schettert IT, Nakamuta JS, Becker C, Tucci PJ, Krieger JE. Intramyocardial transplantation of fibroblasts expressing vascular endothelial growth factor attenuates cardiac dysfunction. *Gene Ther* 2010; 17: 305–14.
39. Rinsch C, Quinodoz P, Pittet B, Alizadeh N, Baetens D, Montandon D, Aebischer P, Pepper MS. Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia. *Gene Ther* 2001; 8: 523–33.
40. Pettersson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Sundberg C, Morgan E, Jungles S, Carter R, Krieger JE, Manseau EJ, Harvey VS, Eckelhoefer IA, Feng D, Dvorak AM, Mulligan RC, Dvorak HF, Jungles S, Carter R, Krieger JE, Manseau EJ, Harvey VS, Eckelhoefer IA, Feng D, Dvorak AM, Mulligan RC, Dvorak HF. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 2000; 80: 99–115.
41. Erdmann D, Sweis R, Wong MS, Niklason LE, du Laney TV, Levin LS, Klitzman B, Olbrich KC. Vascular endothelial growth factor expression in pig latissimus dorsi myocutaneous flaps after ischemia reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111: 775–80.
42. van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 1997; 95: 1030–7.
43. Chen ZG, Persons B, Lin L, Lineaweaver WC, Zhang F. Vascular endothelial growth factor upregulates inducible nitric oxide synthase expression in the muscle flap ischemia model in the rat. *J Reconstr Microsurg* 2009; 25: 219–25.
44. Couffignal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzembichler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 152: 1667–79.



45. Jia Y, Qin J, Zhi Z, Wang RK. Ultrahigh sensitive optical microangiography reveals depth-resolved microcirculation and its longitudinal response to prolonged ischemic event within skeletal muscles in mice. *J Biomed Opt* 2011; 16: 086004.
46. Diamond MP, El-Hammady E, Munkarah A, Bieber EJ, Saed G. Modulation of the expression of vascular endothelial growth factor in human fibroblasts. *Fertil Steril* 2005; 83: 405–9.
47. Imoukhuede PI, Dokun AO, Annex BH, Popel AS. Endothelial cell-by-cell profiling reveals the temporal dynamics of VEGFR1 and VEGFR2 membrane localization after murine hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 304: H1085–93.
48. Imoukhuede PI, Popel AS. Quantification and cell-to-cell variation of vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res* 2011; 317: 955–65.
49. Hoefer IE, van Royen N, Buschmann IR, Piek JJ, Schaper W. Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 609–17.

## Figure captions

Fig. 1. Postoperative VEGF expression in the subcutaneous hypoxic tissue. The bars show the mean and the error bars indicate the standard deviation; asterisks (\*) mark significant differences in expression.

Fig. 2. Postoperative VEGF expression in the distal muscular hypoxic tissue. The bars show the mean and the error bars indicate the standard deviation; asterisks (\*) mark significant differences in expression.

Fig. 3. Immunohistochemical illustration of CD31-positive blood vessels; original magnification  $\times 400$ . (A) Postoperative day 3; (B) postoperative day 5; (C) postoperative day 7; (D) postoperative day 14.

Fig. 4. Immunohistochemical illustration of alpha-SMA-positive blood vessels; original magnification  $\times 400$ . (A) Postoperative day 3; (B) postoperative day 5; (C) postoperative day 7; (D) postoperative day 14.

Fig. 5. Histomorphometric assessment of the neovascularization in the subcutaneous application region. The bars show the mean and the error bars indicate the standard deviation; asterisks (\*) mark significant differences. (A) Number of CD31-positive vessels/HPF. (B) Sum of CD31-positive vessel luminal area/total area of the visual field (%). (C) Number of alpha-SMA-positive arterioles/HPF. (D) Sum of alpha-SMA-positive arteriole luminal area/total area of the visual field (%).

Fig. 6. Histomorphometric assessment of the neovascularization in the distal muscular application region. The bars show the mean and the error bars indicate the standard deviation; asterisks (\*) mark significant differences. (A) Number of CD31-positive vessels/HPF. (B) Sum of CD31-positive vessel luminal area/total area of the visual field (%). (C) Number of alpha-SMA-positive arterioles/HPF. (D) Sum of alpha-SMA-positive arteriole luminal area/total area of the visual field (%).

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Verschiedene Applikationssysteme im Vergleich

In zahlreichen Studien konnte die Perfusionssteigerung durch den Einsatz von VEGF belegt werden. Es zeigte sich jedoch in verschiedenen Versuchen auch, dass VEGF bei unkontrollierten Übertritt ins Blut und darauf folgend die systemische Wirkung die Neovaskularisation von okkulten Tumoren anregt (Carmeliet 2005, Kim et al. 1993). Ziel ist es ein sicheres und wirkungsvolles Applikationssystem zur kontrollieren Induktion der therapeutischen Angiogenese zu entwickeln. Ebenfalls problematisch bezüglich der Effektivität in der Verwendung von VEGF zur Neoangiogenese zeigt sich die kurze Halbwertszeit (Zhang et al. 2004). Aufgrund dieser Problematik ist es erforderlich VEGF mittels eines geeigneten Applikationssystems an den Zielort zu transportieren um seine Eigenschaften zu wahren und die Halbwertszeit zu verlängern (Grdisa 2011).

Die intravenöse Injektion von VEGF zeigte zwar eine signifikante Verbesserung der Durchblutung im ischämische Hinterlaufmodell am Hasen, jedoch war dies mit Hypotonie als Nebeneffekt verbunden (Hariawala et al. 1996). Die intraarterielle Injektion zeigte kaum Effekte aufgrund der kurzen Halbwertszeit und Instabilität der Wachstumsfaktoren (Pearlman et al. 1995, Takeshita et al. 1994a, Giordano et al. 1996, Harada et al. 1994).

Eine Möglichkeit für eine kontrollierte und lokale Wachstumsfaktorfreisetzung stellte die Verwendung von polymer-basierter Hyrogel-Technologie anhand eines Protein-Delivery-Systems dar (Formiga et al. 2012, Simon-Yarza et al. 2012, Katoh 2013). Proteine sind instabile Systeme mit Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. Die Primärstruktur basiert auf der Aminosäuresequenz, wohingegen höhere Strukturen sich auf Proteinfaltung beziehen. Die chemische Instabilität ist auf die Modifikation des ersten Levels zurückzuführen, wie beispielsweise Oxidation und fehlerhafte Disulfidbildung. Physikalische Instabilität betrifft die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen durch beispielsweise Denaturierung und Aggregation. Diese Instabilitäten resultieren in einer kurzen Halbwertszeit von VEGF wenn der Wachstumsfaktor direkt in das Gewebe eingebracht wird (Simon-Yarza et al. 2012). Rui et al. zeigten in ihrer Studie ein Maximum der VEGF Konzentration in den ersten 24h. Während des vierwöchigen Untersuchungszeitraumes konnte eine kontinuierliche Bioaktivität verzeichnet werden (Rui et al. 2012). Greve et al. konnten

erst am 5. Tag nach Injektion der Wachstumsfaktoren eine Verdopplung der Arteriogenese feststellen (Greve et al. 2006). Wilke et al. kombinierte die Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren mittels der Einbindung in Fibrinkleber. Es bestätigte die verlängerte Expression von Wachstumsfaktoren (Wilcke et al. 2007).

Ein anderes vielversprechendes Applikationssystem um die Angiogenese mittels VEGF zu induzieren stellt die Gentherapie dar. Ziel ist es, genetisches Material in die Zielzelle oder Zielgewebe zu integrieren. Es besteht die Möglichkeit des viral und nicht-viral vermittelten Gentransfers. Die viral-basierten Techniken machen sich die Eigenschaften der Viren zu Nutze, in die Wirtszellen einzudringen und neue genetische Information in die Zelle zu implantieren. Die Zelle verwendet diese Gene nun für die Produktion neuer Proteine. Der VEGF Transport basierend auf Adenoviren hat den Vorteil das eine hochgradige Transduktion und Transgenexpression (Muhlhauser et al. 1995). Jedoch zeigten sich bei den adenoviralen Vektoren direkte zytopathologische Effekte. Sie können eine starke Immunantwort auf virale und fremde transgene Proteine und damit eine signifikante Inflammation und Elimination von viral veränderten Zellen hervorrufen (Acsadi et al. 1994, Yang et al. 1994, Yang et al. 1996, Lee et al. 2005, Cristiano 1998). Trotz der hohen Effizienz dieses Applikationssystems bestehen aufgrund des pathologischen Potentials zahlreiche Sicherheitsbedenken. Nicht-virale Methoden wiederum zeigten sich als weniger effizient. 1998 entwickelte Amaxa Biosystems eine neue nicht-virale Transfektionsmethode – die Nukleofektion. Die auf der Elektroexporation basierende Gentransfermethode veranlasst bei den Zielzellen durch die Applikation von elektrischen Pulsen in einem speziellen Puffersystem die Aufnahme von Fremd-DNA (Gresch et al. 2004). Bertram et al. zeigten in ihrem Versuch eine Transfektionseffizienz von 80% neuraler Stamm- und Progenitorzellen mit einer Überlebensrate von über 48h (Bertram et al. 2012). Die Nukleofektion stellt somit eine effiziente Alternative zu dem viralen Gentransfer dar.

### 5.2 Untersuchung des Applikationszeitpunktes

Therapeutische Angiogenese ist ein vielversprechendes Konzept zur Behandlung von Gewebeischämie, Wundheilung und ähnlichen Erkrankungen auf dem Gebiet der Vaskularisation.

Vertreter der Vascular Endothelial Growth Factor Familie sind einige der einflussreichsten Modulatoren der Neovaskularisation sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Aspekten. Zahlreiche Studien dienen der Untersuchung der exakten Rolle von VEGF während des Prozesses der Angiogenese, obgleich gezeigt werden konnte, dass die Neubildung von Gefäßen einer hochspezifischen Regulation und einem Zusammenspiel zahlreicher Mediatoren unterliegt (Ferrara 2002). Gleichzeitig zeigt sich Hypoxie als ein bedeutender Auslöser für die VEGF-Expression (Forsythe et al. 1996). Trotz diverser präklinischer Studien und Tiermodellen der therapeutischen Angiogenese zeigen sich immer wieder Schwierigkeiten, die experimentellen Erkenntnisse in klinisch nützliche Ansätze umzuwandeln (Yla-Herttuala 2006).

In der vorangegangenen Untersuchung von Müller et al. ist die Funktionalität von autologen transfektierten Fibroblasten per Nukleofektion dargestellt worden (Mueller et al. 2010). Sie zeigen eine VEGF-Expression über den Zeitraum von 14 Tagen mit einem Maximum am 3. p.o. Tag. In dieser Arbeit bestätigt sich die Möglichkeit der autologen Transfektion durch Nukleofektion.

In der Hypoxie-induzierten VEGF-165 Versuchsgruppe verläuft die aktive VEGF-Expression ebenfalls über eine Periode von 14 Tagen, jedoch ergeben sich Unterschiede zu den vorangegangenen Studien von Mueller et al. Die höchste VEGF-Expression ergibt sich bei subkutaner Injektion am 5. und 14. p.o. Tag und bei muskulärer Injektion im distalen Bereich am 7. und 14. p.o. Tag, im proximalen Bereich am 3. und 7. p.o. Tag. Somit können im subkutanen und distalen Injektionsbereich das Ergebnis der VEGF-Expression über 14 Tage bestätigt werden, jedoch mit anderen Maxima als in der Arbeit von Mueller et al. Es zeigen sich zu allen Injektionszeitpunkten Höchstwerte der VEGF-Expression, jedoch in unterschiedlichen Injektionsbereichen. Interessant ist, dass im subkutanen Injektionsbereich am 5. und 14. p.o. Tag ein Maximum an VEGF-Expression zu verzeichnen ist, demnach genau dann, wenn die physiologische VEGF-Expression nach 3. p.o. Tag abfällt und die Hypoxie ansteigt. Im distalen Muskelbereich finden

sich spätere Höchstwerte am 7. und 14. p.o. Tag wie erwartet und in vorangegangenen Studien bestätigt.

Gurunluoglu et al. untersucht die Möglichkeit der erhöhten Transplantatvorbereitung durch subkutane Injektionen von adenoviral-kodierenden VEGF. Die Funktionsfähigkeit der Transplantate wird mittels Mikroangiografie am 7. p.o. Tag untersucht und es zeigt sich ein signifikant erhöhtes Überleben der mit VEGF-vorbereiteten Lappenplastiken, wenngleich die histomorphologische Auswertung keinen Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe zeigen (Gurunluoglu et al. 2005). Lubiatowski et al. zeigen ebenso eine erhöhte Funktionalität am 7. und 14. p.o. Tag bei Lappenplastiken in Kombination mit der signifikanten Reduktion von hypoxischen und nekrotischen Arealen durch die Nutzung von Gentherapie mittels VEGF-kodierenden Adenoviren (Lubiatowski et al. 2002). Jedoch zeigt auch hier die histologische Auswertung keine quantitativen Unterschiede (Cristiano et al. 1998).

Während der Untersuchung des Applikationszeitpunktes stellt sich heraus, dass die Versuchsgruppe des Hypoxie-induzierten VEGF-Vektors im subkutanen Bereich Höchstwerte der Anzahl der CD31-positiven Blutgefäße am 14. p.o. Tag aufzuweisen haben und somit den Arbeiten von Gurunluoglu und Lubiatowski trotz unterschiedlichen Versuchsaufbaus weitestgehend zustimmen. Im muskulären Injektionsbereich verlagert sich die Anzahl der meisten Blutgefäße auf den 5. p.o. Tag und somit eher als vermutet.

Bei der Auswertung der alphaSMA-positiven Arteriolen ergeben sich die Maximalwerte sowohl in Anzahl als auch bei dem Verhältnis von Anzahl zu Gesamtfläche um den 5. p.o. Tag. im subkutanen Injektionsbereich. Im muskulären Bereich ergibt sich ein Gipfel der Werte um den 3. p.o. Tag. Demnach ist die Ausbildung arterieller Strukturen zeitlich eher anzusiedeln. Die histologische Auswertung der Resultate bestätigt die VEGF-Expressionsaktivität und die Ausbildung von normalen Blutgefäßen in der Versuchsgruppe.

### **5.3 Veränderung der Kapillaraussprossung**

Takashita et al. zeigen in verschiedenen Modellen mit künstlich hervorgerufener chronischer Ischämie der Hintergliedmaßen mittels chirurgischer Entfernung der Arteria femoralis, dass die intraarterielle oder intramuskuläre Anwendung von VEGF<sub>165</sub> eine signifikante Erhöhung der Perfusion und Entwicklung von

Kollateralgefäßen ergibt (Takeshita et al. 1994b, Takeshita et al. 1994a). Diese Studien geben einen Hinweis auf Neovaskularisation in ischämischen Gliedmaßen. Bauters et al. untersucht den maximalen Blutfluss und die maximale Blutflussgeschwindigkeit in ischämischen Gliedmaßen bei VEGF-induzierten Vaskularisation und zeigt signifikante erhöhte Ergebnisse in der VEGF-Versuchsgruppe (Bauters et al. 1994).

Die immunhistochemischen Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen ebenfalls eine hochgradige Vermehrung der Gefäßaussprossung in allen Injektionsbereichen mit dem Hypoxie-induzierten Vektor, hauptsächlich jedoch im subkutanen Anwendungsbereich und lassen auf eine verbesserte Perfusion des Gewebes schließen. Ebenfalls sind im Lumen einzelner Kapillaren Erythrozyten zu sehen, so dass von einem funktionierenden Blutfluss auszugehen ist. Demnach stimmen diese Ergebnisse mit Studien von Mueller et al. überein und bestätigen die Effektivität des Hypoxie-induzierten VEGF<sub>165</sub>-Vektors.

Bereits 1994 finden Banai et al. eine weitere mögliche therapeutische Verwendung von VEGF. Sie zeigen einen vermehrten Blutfluss durch maximale Kollateralbildung nach dem Verschluss des Ramus circumflexus der linken Koronararterie und täglicher rhVEGF-Injektion distal des Verschlusses über den Zeitraum von vier Wochen (Banai et al. 1994). In zahlreichen präklinischen Studien in den vergangenen Jahren zeigt sich durchgehend, dass Gentransfer von VEGF-A, -C, und -D die Restenosierung nach Arterienverletzung vorbeugen kann (Asahara et al. 1995, Hiltunen et al. 2000, Laitinen et al. 1997, Leppanen et al. 2004, Rutanen et al. 2005).

Im Bereich der Lappenchirurgie werden Verluste der Transplantate aufgrund von Ischämien bedingt durch schlechte Vaskularisation oder Komorbiditäten, bspw. aufgrund von Diabetes mellitus oder Bestrahlungsschäden, verzeichnet. Im Fall der ischämiebedingten Lappenmodelle stellt sich in vivo Gentherapie als eine der besten Methoden heraus. Adenoviren sind im Moment die effektivsten Gentransportmedien mit dem Vorteil der natürlichen Fähigkeit, Wirtszellen zu penetrieren und genetisches Material in den Nukleus zu transferieren (Cavazzana-Calvo et al. 2000, Krisky et al. 1998). Cui et al. stellen in ihrem Versuch fest, dass die Überlebensrate der Transplantatlappen in der AdCMV-VEGF-Gruppe signifikant erhöht ist gegenüber der Kontrollgruppe. Die vermehrte VEGF-Expression bestätigt sich ebenfalls in der

immunhistochemischen Untersuchung. Histologisch wird vermehrt Granulationsgewebe und Angiogenese detektiert (Cui et al. 2003).

Rinsch et al. stellen dar, dass ex vivo Gentherapiemodelle auch eine gute Möglichkeit der VEGF-gesteuerten Neovaskularisation bei Lappentransplantaten ist. Während der Studie werden Zelllinien von Myoblasten aus Mäusen transfektiert und in mikroporöse Polymermembranen zur in vivo Transplantation integriert. Die therapeutische Effektivität wird am Modell der akuten Ischämie von Hautlappen evaluiert und zeigt eine moderate Vaskularisation, während 50% der Kontrollplastiken nach einer Woche Nekrose aufweisen (Rinsch et al. 2001). Zudem zeigt Spanholtz et al. eine stabile Blutgefäßbildung und Verbesserung der Ischämie in Hauttransplantaten durch die Behandlung von zellbasierenden Gentransfer von Fibroblasten mit VEGF165 und basic fibroblast growth factor (bFGF) (Spanholtz et al. 2011).

Neben der Wahl des Transportmediums scheinen zwei weitere Variablen den angiogenen Effekt von VEGF beeinflussen. Dazu zählt zum einen die lokale Wachstumsfaktorkonzentration als Schlüssel für den Vaskularisierungsgrad (Ozawa et al. 2004), zum anderen das Volumen pro Injektion und die Injektionsanzahl (Rissanen et al. 2003a, Rutanen et al. 2004). Weiterhin liefert die intramuskuläre Injektion weitaus höhere VEGF-Expression und Angiogeneseeffekte im Zielgewebe mit weniger ektopischer Genexpression als intraarterielle Injektion (Rissanen et al. 2003b). Rekombinant hergestellte VEGF-proteine und nackte plasmid-vermittelte VEGF-Gentransfers sind nicht genügend effektiv um suffiziente biologische Effekte zu erzielen (Henry et al. 2003, Kastrup et al. 2005, Rutanen et al. 2004).



### 6 SCHLUSSFOLGERUNG

Die Induktion der Angiogenese mittels VEGF ist seit geraumer Zeit Gegenstand vieler Studien. VEGF stellte sich als potentieller Aktivator der Neovaskularisation bei Wund- und Frakturheilung, Kollateralbildung bei ischämiebedingtem Gewebeuntergang, nicht heilenden Ulcera sowie im Bereich der Lappenplastiken bei multimorbiden und oft radioaktiv behandelten Patienten.

Im Rahmen dieser Studie kann gezeigt werden, dass autologe Zellen effizient durch Nukleofektion transfiziert werden können und eine transiente Genexpression bis Tag 14 nachweisbar ist. Durch die Injektion von VEGF im subkutanen Gewebereich kann eine signifikant erhöhte VEGF-Expression im Vergleich zu nicht-transfizierten Fibroblasten oder der Kontrollgruppe erzielt werden. Es zeigt sich eine vermehrte Kapillar- und Arteriolenaussprossung zu allen Injektionszeitpunkten. Im muskulären Injektionsbereich wird eine niedrigere Vaskularisation als im subkutanen Bereich festgestellt.

Ein wichtiger Endpunkt aller VEGF-Studien beinhaltet die Sicherheit. Die Stimulation von VEGF erregt die Diskussion der pathologischen Angiogenese im Bereich von Tumorwachstum, rentaler Vaskularisation und fehlerhaft ausgebildeten Gefäßen einschließlich deren Ruptur. Bei der Untersuchung der VEGF-induzierten Angiogenese in vorangegangenen Studien dieser Arbeitsgruppe können diese Bedenken nicht bestätigt werden. Auch zeigt sich in klinischen Studien mit VEGF-A-Proteinen bisher keine erhöhte Tumorgenese, Neovaskularisation in Nicht-Zielorganen oder vaskuläre Malformationen (Yla-Herttuala und Alitalo 2003).

Noch kann die vielversprechende präklinische Effektivität der VEGF-induzierten Angiogenese nicht vollständig zufriedenstellend in die klinische Phase übergehen. Ein Grund dafür mag der große Unterschied zwischen Tiermodellen und Menschen sein. Die Tiere sind meist gesund, jung und dementsprechend in der Lage, eine andere effektive angiogene Antwort auf den zusätzlichen Stimulus durch Gentherapie zu geben als Patienten mit extensiven veränderten Begleitumständen (Makinen et al. 2002, Vranckx et al. 2005). Die erfolgreiche Übertragung in den klinischen Abschnitt ist demnach Gegenstand zukünftiger Studien.

## 7 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. 1998. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (2):548-553.
- Acsadi G, Jani A, Massie B, Simoneau M, Holland P, Blaschuk K, Karpati G. 1994. A differential efficiency of adenovirus-mediated in vivo gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity. *Hum Mol Genet*, 3 (4):579-584.
- Adams RH, Alitalo K. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (6):464-478.
- Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. 1995. Local Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Reendothelialization and Attenuates Intimal Hyperplasia in Balloon-Injured Rat Carotid Artery. *Circulation*, 91 (11):2793-2801.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275 (5302):964-967.
- Ashrafpour H, Huang N, Neligan PC, Forrest CR, Addison PD, Moses MA, Levine RH, Pang CY. 2004. Vasodilator effect and mechanism of action of vascular endothelial growth factor in skin vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286 (3):H946-954.
- Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, Epstein SE, Unger EF. 1994. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*, 89 (5):2183-2189.
- Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*, 87 (8):3336-3343.
- Bauer SM, Bauer RJ, Liu ZJ, Chen H, Goldstein L, Velazquez OC. 2005. Vascular endothelial growth factor-C promotes vasculogenesis, angiogenesis, and collagen constriction in three-dimensional collagen gels. *J Vasc Surg*, 41 (4):699-707.
- Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. 1994. Physiological assessment of augmented vascularity induced by VEGF in ischemic rabbit hindlimb. *Am J Physiol*, 267 (4 Pt 2):H1263-1271.
- Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. 1995. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Letters*, 372 (1):83-87.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28 (1):235-242.
- Bertram B, Wiese S, von Holst A. 2012. High-efficiency transfection and survival rates of embryonic and adult mouse neural stem cells achieved by electroporation. *J Neurosci Methods*, 209 (2):420-427.
- Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, Eberlein TJ, Klagsbrun M. 1994. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (8):2890-2894.

- Burri PH, Tarek MR. 1990. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *The Anatomical Record*, 228 (1):35-45.
- Carmeliet P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9 (6):653-660.
- Carmeliet P. 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3:4-10.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380 (6573):435-439.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288 (5466):669-672.
- Christenson LK, Stouffer RL. 1997. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, 82 (7):2135-2142.
- Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martinez De La Escalera G. 2009. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev*, 89 (4):1177-1215.
- Clark RA. 1993. Biology of dermal wound repair. *Dermatol Clin*, 11 (4):647-666.
- Clark RA, Nielsen LD, Welch MP, McPherson JM. 1995. Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta. *J Cell Sci*, 108 ( Pt 3):1251-1261.
- Clemetson KJ. 2012. Platelets and Primary Haemostasis. *Thrombosis Research*, 129 (3):220-224.
- Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. 1996. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 271 (2):736-741.
- Cristiano RJ. 1998. Viral and non-viral vectors for cancer gene therapy. *Anticancer Res*, 18 (5A):3241-3245.
- Cristiano RJ, Xu B, Nguyen D, Schumacher G, Kataoka M, Spitz FR, Roth JA. 1998. Viral and nonviral gene delivery vectors for cancer gene therapy. *Cancer Detect Prev*, 22 (5):445-454.
- Crivellato E, Nico B, Vacca A, Djonov V, Presta M, Ribatti D. 2004. Recombinant human erythropoietin induces intussusceptive microvascular growth in vivo. *Leukemia*, 18 (2):331-336.
- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. 2003. VEGF-receptor signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*, 28 (9):488-494.
- Cui L, Li FC, Zhang Q, Qian YL, Guan WX. 2003. Effect of adenovirus-mediated gene transfection of vascular endothelial growth factor on survival of random flaps in rats. *Chin J Traumatol*, 6 (4):199-204.
- Derynck R. 1986. Transforming growth factor-alpha: structure and biological activities. *J Cell Biochem*, 32 (4):293-304.
- Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. 1995. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*, 146 (1):56-66.
- Drake CJ. 2003. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 69 (1):73-82.
- Dvorak HF. 2000. VPF/VEGF and the angiogenic response. *Semin Perinatol*, 24 (1):75-78.

- Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R. 1998. Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol*, 153 (6):1849-1860.
- Ferrara N. 2002. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*, 2 (10):795-803.
- Ferrara N, Henzel WJ. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161 (2):851-858.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18 (1):4-25.
- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. 1992. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*, 13 (1):18-32.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380 (6573):439-442.
- Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. 1998. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med*, 4 (3):336-340.
- Finkenzeller G, Sparacio A, Technau A, Marme D, Siemeister G. 1997. Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene*, 15 (6):669-676.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376 (6535):66-70.
- Formiga FR, Tamayo E, Simon-Yarza T, Pelacho B, Prosper F, Blanco-Prieto MJ. 2012. Angiogenic therapy for cardiac repair based on protein delivery systems. *Heart Fail Rev*, 17 (3):449-473.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 16 (9):4604-4613.
- Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. 1995. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, 270 (21):12607-12613.
- Gillitzer R, Goebeler M. 2001. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol*, 69 (4):513-521.
- Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD, Nozaki S, DeMaria AN, Dillmann WH, Mathieu-Costello O, Hammond HK. 1996. Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nat Med*, 2 (5):534-539.
- Gray AJ, Bishop JE, Reeves JT, Laurent GJ. 1993. A alpha and B beta chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts. *J Cell Sci*, 104 ( Pt 2):409-413.
- Grdisa M. 2011. The delivery of biologically active (therapeutic) peptides and proteins into cells. *Curr Med Chem*, 18 (9):1373-1379.
- Gresch O, Engel FB, Nesic D, Tran TT, England HM, Hickman ES, Korner I, Gan L, Chen S, Castro-Obregon S, Hammermann R, Wolf J, Muller-Hartmann H, Nix

- M, Siebenkotten G, Kraus G, Lun K. 2004. New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods*, 33 (2):151-163.
- Greve JM, Chico TJ, Goldman H, Bunting S, Peale FV, Jr., Daugherty A, van Bruggen N, Williams SP. 2006. Magnetic resonance angiography reveals therapeutic enlargement of collateral vessels induced by VEGF in a murine model of peripheral arterial disease. *J Magn Reson Imaging*, 24 (5):1124-1132.
- Gridley T. 2001. Notch signaling during vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (10):5377-5378.
- Grimmond S, Lagercrantz J, Drinkwater C, Silins G, Townson S, Pollock P, Gotley D, Carson E, Rakar S, Nordenskjold M, Ward L, Hayward N, Weber G. 1996. Cloning and characterization of a novel human gene related to vascular endothelial growth factor. *Genome Res*, 6 (2):124-131.
- Gurunluoglu R, Meirer R, Shafighi M, Huemer GM, Yilmaz B, Piza-Katzer H. 2005. Gene therapy with adenovirus-mediated VEGF enhances skin flap prefabrication. *Microsurgery*, 25 (5):433-441.
- Hanahan D. 1997. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*, 277 (5322):48-50.
- Harada K, Grossman W, Friedman M, Edelman ER, Prasad PV, Keighley CS, Manning WJ, Sellke FW, Simons M. 1994. Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J Clin Invest*, 94 (2):623-630.
- Hariawala MD, Horowitz JR, Esakof D, Sheriff DD, Walter DH, Keyt B, Isner JM, Symes JF. 1996. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res*, 63 (1):77-82.
- Harry LE, Paleolog EM. 2003. From the cradle to the clinic: VEGF in developmental, physiological, and pathological angiogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 69 (4):363-374.
- Heldin CH, Westermark B. 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, 79 (4):1283-1316.
- Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. 1999. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 126 (14):3047-3055.
- Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER. 2003. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*, 107 (10):1359-1365.
- Hicklin DJ, Ellis LM. 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 23 (5):1011-1027.
- Hiltunen MO, Laitinen M, Turunen MP, Jeltsch M, Hartikainen J, Rissanen TT, Laukkanen J, Niemi M, Kossila M, Hakkinen TP, Kivela A, Enholm B, Mansukoski H, Turunen AM, Alitalo K, Yla-Herttuala S. 2000. Intravascular adenovirus-mediated VEGF-C gene transfer reduces neointima formation in balloon-denuded rabbit aorta. *Circulation*, 102 (18):2262-2268.
- Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*, 56 (4):549-580.
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*, 267 (36):26031-26037.

- Hunt TK. 1980. Wound Healing and Wound Infection: Theory and Surgical Practice. New York, NY: Appleton-Century-Crofts.
- Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. 1997. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*, 276 (5317):1423-1425.
- Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M, Pajusola K, Olofsson B, Kumar V, Eriksson U, Alitalo K. 1997. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *Journal of Cellular Physiology*, 173 (2):211-215.
- Kalka C, Asahara T, Krone W, Isner JM. 2000. [Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization]. *Herz*, 25 (6):611-622.
- Kamei M, Saunders WB, Bayless KJ, Dye L, Davis GE, Weinstein BM. 2006. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature*, 442 (7101):453-456.
- Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tagil K, Glogar D, Ruzyllo W, Botker HE, Dudek D, Drvota V, Hesse B, Thuesen L, Blomberg P, Gyongyosi M, Sylven C. 2005. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol*, 45 (7):982-988.
- Katoh M. 2013. Therapeutics targeting angiogenesis: genetics and epigenetics, extracellular miRNAs and signaling networks (Review). *Int J Mol Med*, 32 (4):763-767.
- Kearney JB, Ambler CA, Monaco KA, Johnson N, Rapoport RG, Bautch VL. 2002. Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division. *Blood*, 99 (7):2397-2407.
- Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 362 (6423):841-844.
- Krisky DM, Wolfe D, Goins WF, Marconi PC, Ramakrishnan R, Mata M, Rouse RJ, Fink DJ, Glorioso JC. 1998. Deletion of multiple immediate-early genes from herpes simplex virus reduces cytotoxicity and permits long-term gene expression in neurons. *Gene Ther*, 5 (12):1593-1603.
- Laitinen M, Zachary I, Breier G, Pakkanen T, Hakkinen T, Luoma J, Abedi H, Risau W, Soma M, Laakso M, Martin JF, Yla-Herttuala S. 1997. VEGF gene transfer reduces intimal thickening via increased production of nitric oxide in carotid arteries. *Hum Gene Ther*, 8 (15):1737-1744.
- Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H, Wood WI. 1996. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (5):1988-1992.
- Lee TW, Matthews DA, Blair GE. 2005. Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem J*, 387 (Pt 1):1-15.
- Leibovich SJ, Ross R. 1975. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*, 78 (1):71-100.
- Leppanen O, Rutanen J, Hiltunen MO, Rissanen TT, Turunen MP, Sjoblom T, Bruggen J, Backstrom G, Carlsson M, Buchdunger E, Bergqvist D, Alitalo K, Heldin CH, Ostman A, Yla-Herttuala S. 2004. Oral imatinib mesylate (STI571/gleevec) improves the efficacy of local intravascular vascular

- endothelial growth factor-C gene transfer in reducing neointimal growth in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*, 109 (9):1140-1146.
- Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. 2009. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 21 (2):154-165.
- Lubiatowski P, Goldman CK, Gurunluoglu R, Carnevale K, Siemionow M. 2002. Enhancement of epigastric skin flap survival by adenovirus-mediated VEGF gene therapy. *Plast Reconstr Surg*, 109 (6):1986-1993.
- Makinen K, Manninen H, Hedman M, Matsi P, Mussalo H, Alhava E, Yla-Herttuala S. 2002. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther*, 6 (1):127-133.
- Martin P. 1997. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276 (5309):75-81.
- Matsumoto K, Ohi H, Kanmatsuse K. 1997. Interleukin 10 and interleukin 13 synergize to inhibit vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells from patients with lipoid nephrosis. *Nephron*, 77 (2):212-218.
- Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, Dehio C. 1999. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*, 18 (2):363-374.
- Mignatti P, Rifkin D, Welgus H, Parks W. 1996. Proteinases and tissue remodeling. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. . Plenum New York:427-474.
- Mole DR, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. 2001. Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life*, 52 (1-2):43-47.
- Mueller CK, Thorwarth MW, Schultze-Mosgau S. 2010. Angiogenic gene-modified fibroblasts for induction of localized angiogenesis. *J Surg Res*, 160 (2):340-348.
- Mueller MD, Vigne J-L, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN. 2000. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (20):10972-10977.
- Muhlhauser J, Merrill MJ, Pili R, Maeda H, Bacic M, Bewig B, Passaniti A, Edwards NA, Crystal RG, Capogrossi MC. 1995. VEGF165 expressed by a replication-deficient recombinant adenovirus vector induces angiogenesis in vivo. *Circ Res*, 77 (6):1077-1086.
- Muller YA, Christinger HW, Keyt BA, de Vos AM. 1997. The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure*, 5 (10):1325-1338.
- Murakami M, Simons M. 2008. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr Opin Hematol*, 15 (3):215-220.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 13 (1):9-22.
- Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. 1998. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol*, 152 (6):1445-1452.
- Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M. 1998. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially

- utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem*, 273 (47):31273-31282.
- Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U. 1996. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (6):2576-2581.
- Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U. 1998. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (20):11709-11714.
- Ortega N, Hutchings H, Plouet J. 1999. Signal relays in the VEGF system. *Front Biosci*, 4:D141-152.
- Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, McDonald DM, Blau HM. 2004. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Invest*, 113 (4):516-527.
- Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. 2006. Angiogenesis--a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol*, 44 (5):265-274.
- Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. 1994. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*, 269 (41):25646-25654.
- Parker LH, Schmidt M, Jin SW, Gray AM, Beis D, Pham T, Frantz G, Palmieri S, Hillan K, Stainier DY, De Sauvage FJ, Ye W. 2004. The endothelial-cell-derived secreted factor Egr1 regulates vascular tube formation. *Nature*, 428 (6984):754-758.
- Patan S. 2004. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res*, 117:3-32.
- Pearlman JD, Hibberd MG, Chuang ML, Harada K, Lopez JJ, Gladstone SR, Friedman M, Sellke FW, Simons M. 1995. Magnetic resonance mapping demonstrates benefits of VEGF-induced myocardial angiogenesis. *Nat Med*, 1 (10):1085-1089.
- Perkett EA, Klekamp JG. 1998. Vascular endothelial growth factor expression is decreased in rat lung following exposure to 24 or 48 hours of hyperoxia: implications for endothelial cell survival. *Chest*, 114 (1 Suppl):52S-53S.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ. 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*, 9 (6):677-684.
- Ribatti D, Djonov V. 2012. Intussusceptive microvascular growth in tumors. *Cancer Lett*, 316 (2):126-131.
- Rinsch C, Quinodoz P, Pittet B, Alizadeh N, Baetens D, Montandon D, Aebischer P, Pepper MS. 2001. Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia. *Gene Ther*, 8 (7):523-533.
- Risau W, Flamme I. 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11:73-91.
- Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Ekblom P, Kemler R, Doetschman T. 1988. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*, 102 (3):471-478.
- Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI, Kholova I, Kauppinen RA, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K, Yla-Herttuala S. 2003a. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector



- among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res*, 92 (10):1098-1106.
- Rissanen TT, Markkanen JE, Arve K, Rutanen J, Kettunen MI, Vajanto I, Jauhiainen S, Cashion L, Gruchala M, Narvanen O, Taipale P, Kauppinen RA, Rubanyi GM, Yla-Herttuala S. 2003b. Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model. *FASEB J*, 17 (1):100-102.
- Roberts AB, Sporn MB. 1996. Transforming growth factor- $\beta$ . In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. Plenum New York:275-308.
- Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. 1986. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, 46 (2):155-169.
- Rui J, Dadsetan M, Runge MB, Spinner RJ, Yaszemski MJ, Windebank AJ, Wang H. 2012. Controlled release of vascular endothelial growth factor using polylactic-co-glycolic acid microspheres: in vitro characterization and application in polycaprolactone fumarate nerve conduits. *Acta Biomater*, 8 (2):511-518.
- Rutanen J, Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Silvennoinen P, Kivela A, Hedman A, Hedman M, Heikura T, Orden MR, Stacker SA, Achen MG, Hartikainen J, Yla-Herttuala S. 2004. Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor-D induces transmural angiogenesis in porcine heart. *Circulation*, 109 (8):1029-1035.
- Rutanen J, Turunen AM, Teittinen M, Rissanen TT, Heikura T, Koponen JK, Gruchala M, Inkala M, Jauhiainen S, Hiltunen MO, Turunen MP, Stacker SA, Achen MG, Yla-Herttuala S. 2005. Gene transfer using the mature form of VEGF-D reduces neointimal thickening through nitric oxide-dependent mechanism. *Gene Ther*, 12 (12):980-987.
- Schipani ECT. 2008. Hypoxia and the hypoxia-inducible factors in the skeleton. *IBMS BoneKey*, 5 (8).
- Schmelzeisen R, Ptak M, Schonweiler R, Hacki T, Neukam FW. 1996. [Reconstruction of speech and chewing function after extensive tumor resection in the area of the jaw and face]. *Laryngorhinootologie*, 75 (4):231-238.
- Schwarzenbach H, Chakrabarti G, Paust HJ, Mukhopadhyay AK. 2004. Gonadotropin-mediated regulation of the murine VEGF expression in MA-10 Leydig cells. *J Androl*, 25 (1):128-139.
- Scrofani SD, Fabri LJ, Xu P, Maccarone P, Nash AD. 2000. Purification and refolding of vascular endothelial growth factor-B. *Protein Sci*, 9 (10):2018-2025.
- Semenza G. 2002. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*, 64 (5-6):993-998.
- Semenza GL. 2007. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE*, 2007 (407):cm8.
- Serini G, Valdembri D, Bussolino F. 2006. Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp Cell Res*, 312 (5):651-658.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376 (6535):62-66.
- Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushima H, Sato M. 1990. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, 5 (4):519-524.

- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359 (6398):843-845.
- Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. 1993. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest*, 91 (5):2235-2243.
- Simon-Yarza T, Formiga FR, Tamayo E, Pelacho B, Prosper F, Blanco-Prieto MJ. 2012. Vascular endothelial growth factor-delivery systems for cardiac repair: an overview. *Theranostics*, 2 (6):541-552.
- Singer AJ, Clark RAF. 1999. Cutaneous Wound Healing. *New England Journal of Medicine*, 341 (10):738-746.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. 1998. Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor. *Cell*, 92 (6):735-745.
- Sorg H, Harder Y, Krueger C, Reimers K, Vogt PM. 2013. The nonhematopoietic effects of erythropoietin in skin regeneration and repair: from basic research to clinical use. *Med Res Rev*, 33 (3):637-664.
- Spanholtz TA, Theodorou P, Holzbach T, Wutzler S, Giunta RE, Machens HG. 2011. Vascular endothelial growth factor (VEGF165) plus basic fibroblast growth factor (bFGF) producing cells induce a mature and stable vascular network--a future therapy for ischemically challenged tissue. *J Surg Res*, 171 (1):329-338.
- Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B. 1987. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol*, 105 (3):1039-1045.
- Stewart RJ, Panigrahy D, Flynn E, Folkman J. 2001. Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma: evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts. *J Urol*, 165 (2):688-693.
- Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. 1994. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol*, 55 (3):410-422.
- Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, Isner JM, Symes JF. 1994a. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation*, 90 (5 Pt 2):II228-234.
- Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. 1994b. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, 93 (2):662-670.
- Terman B, Khandke L, Dougher-Vermazan M, Maglione D, Lassam NJ, Gospodarowicz D, Persico MG, Bohlen P, Eisinger M. 1994. VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor. *Growth Factors*, 11 (3):187-195.
- Veikkola T, Alitalo K. 1999. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol*, 9 (3):211-220.
- Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. 1996. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 93 (8):1493-1495.
- Vranckx JJ, Yao F, Petrie N, Augustinova H, Hoeller D, Visovatti S, Slama J, Eriksson E. 2005. In vivo gene delivery of Ad-VEGF121 to full-thickness

- wounds in aged pigs results in high levels of VEGF expression but not in accelerated healing. *Wound Repair Regen*, 13 (1):51-60.
- Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 269 (43):26988-26995.
- Wang GL, Semenza GL. 1995. Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (3):1230-1237.
- Wang ZG, Puri TS, Quigg RJ. 2010. Characterization of novel VEGF (vascular endothelial growth factor)-C splicing isoforms from mouse. *Biochem J*, 428 (3):347-354.
- Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB. 1996. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem*, 271 (46):29483-29488.
- Welch MP, Odland GF, Clark RA. 1990. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol*, 110 (1):133-145.
- Wilcke I, Lohmeyer JA, Liu S, Condurache A, Kruger S, Mailander P, Machens HG. 2007. VEGF(165) and bFGF protein-based therapy in a slow release system to improve angiogenesis in a bioartificial dermal substitute in vitro and in vivo. *Langenbecks Arch Surg*, 392 (3):305-314.
- Wilting J, Birkenhager R, Eichmann A, Kurz H, Martiny-Baron G, Marme D, McCarthy JE, Christ B, Weich HA. 1996. VEGF121 induces proliferation of vascular endothelial cells and expression of flk-1 without affecting lymphatic vessels of chorioallantoic membrane. *Dev Biol*, 176 (1):76-85.
- Xu J, Clark RA. 1996. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *J Cell Biol*, 132 (1-2):239-249.
- Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y. 1997. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics*, 42 (3):483-488.
- Yang Y, Ertl HC, Wilson JM. 1994. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity*, 1 (5):433-442.
- Yang Y, Haecker SE, Su Q, Wilson JM. 1996. Immunology of gene therapy with adenoviral vectors in mouse skeletal muscle. *Hum Mol Genet*, 5 (11):1703-1712.
- Yla-Herttuala S. 2006. An update on angiogenic gene therapy: vascular endothelial growth factor and other directions. *Curr Opin Mol Ther*, 8 (4):295-300.
- Yla-Herttuala S, Alitalo K. 2003. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med*, 9 (6):694-701.
- Zachary IC, Frankel P, Evans IM, Pellet-Many C. 2009. The role of neuropilins in cell signalling. *Biochem Soc Trans*, 37 (Pt 6):1171-1178.
- Zhang F, Waller W, Lineaweaver WC. 2004. Growth factors and flap survival. *Microsurgery*, 24 (3):162-167.
- Zhang F, Lei MP, Oswald TM, Pang Y, Blain B, Cai ZW, Lineaweaver WC. 2003. The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischaemic skin wounds. *Br J Plast Surg*, 56 (4):334-341.
- Zheng Y, Yi CG, He LJ, Wang YM, Feng SQ, Liu D, Guo SZ. 2007. [Effects of mouse NIH3T3 cells transfected with VEGF gene on neovascularization of ischemic flaps]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 45 (3):203-206.

## 8 ANHANG

### 8.1 Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name:	Eggers
Vorname:	<u>Cornelia</u> Anja
Geburtsdatum:	13. April 1984
Geburtsort:	Rudolstadt
Familienstand:	ledig
Anschrift:	Zeigerheimer Weg 28 07422 Bad Blankenburg
Eltern:	Rainhard Eggers; Schulamtsdirektor a.D. Dr. Christina Eggers; Psychologische Psychotherapeutin
Geschwister:	Dr. med. Ralf Eggers; FA Innere Medizin & FA Kardiologie Marco Eggers; Diplom-Jurist, MM
Staatsangehörigkeit:	BRD

#### Ausbildung

09/1990 – 08/1994	Grundschule Bad Blankenburg
09/1994 – 06/2003	Friedrich-Fröbel-Gymnasium Bad Blankenburg <i>Abschluss:</i> Abitur
10/2003 – 09/2006	Studium Internationale Betriebswirtschaftslehre Euro-Business-College Jena <i>Abschluss:</i> Diplom
04/2006 – 09/2007	Fernstudium International Business University of Sunderland <i>Abschluss:</i> Bachelor of Arts of Honours
10/2007 – 03/2008	Ausbildung NAW Berlin <i>Abschluss:</i> Rettungssanitäter
08/2008 – 02/2015	Studium Humanmedizin; FSU Jena
02/2011 – 10/2014	Doktorand Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Jena

### Besondere Kenntnisse

08/2000 – 08/2001	Schuljahr USA, Grand Rapids, Michigan
07/2004 – 10/2004	Praktikum Trumpf Medizin Systeme GmbH
02/2005 – 05/2005	Auslandssemester EBS Dublin, Irland
06/2005 – 09/2005	Auslandspraktikum Europa Goldcar Alicante, Spanien
08/2013 – 12/2014	PJ Innere Medizin, Thüringen Klinik, Rudolstadt
12/2013 – 03/2014	PJ MKG, Universitätsklinikum Jena
03/2014 – 07/2014	PJ Chirurgie, Kantonsspital Olten, Schweiz

### Sprachbildung

Englisch	fließend in Wort und Schrift
Spanisch	gute Grundkenntnisse

Jena, den 3. Juni 15

Cornelia Eggers

## **8.2 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Dr. S. Schulze-Mosgau

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 3. Juni 15

---

Cornelia Eggers

### 8.3 Danksagung

Hiermit danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Schulze-Mosgau für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung dieser Arbeit in der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie/ Plastische Chirurgie sowie die wissenschaftliche Betreuung und Förderung.

Frau Dr. Mtsariashvili danke ich für die freundliche Aufnahme im Labor und die tatkräftige Unterstützung während der Versuchsdurchführung.

Herrn Dr. Lehmann gilt mein Dank für die ausgezeichnete Hilfestellung bei der statistischen Auswertung.

Des Weiteren danke ich dem IVTK für die Betreuung und Pflege der Tiere während des Versuchszeitraumes.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die allumfassende Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.